

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Molekulare Analyse des
TRPC6-Kanals während der Ausbildung
einer pulmonalen Fibrose**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Katharina Maria Hofmann

aus München

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer:	Prof. Dr. Alexander Dietrich
Zweitgutachter:	Priv. Doz. Dr. Carsten Rudolph
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	25.01.2018

Meinen Eltern
Silvia und Andreas Hofmann

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1 EINLEITUNG	4
1.1 DIE IDIOPATHISCHE LUNGENFIBROSE	4
1.1.1 DEFINITION	4
1.1.2 EPIDEMIOLOGIE	4
1.1.3 RISIKOFAKTOREN	6
1.1.4 PATHOLOGIE DER IDIOPATHISCHEN LUNGENFIBROSE	6
1.1.4.1 Pathomechanismus	7
1.1.4.2 Lungenfibroblasten	9
1.1.5 SYMPTOME UND DIAGNOSE DER IPF	13
1.1.6 THERAPIE DER IPF	15
1.2 DIE BLEOMYCIN-INDUZIERTER LUNGENFIBROSE ALS TIERMODELL FÜR DIE IPF	16
1.3 TRP-KANÄLE	18
1.3.1 DIE SUPERFAMILIE DER TRP-KANÄLE: STRUKTUR UND FUNKTION	18
1.3.2 TRPC-KANÄLE	22
1.3.3 TRPC6-KANÄLE	23
1.3.3.1 Proteinstruktur des TRPC6	23
1.3.3.2 TRPC6-Signalkaskaden	25
1.3.3.3 Gewebsspezifische Expression und Funktion des TRPC6-Kanals	26
1.3.3.4 Pharmakologie des TRPC6	28
1.4 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	30
2 MATERIAL UND METHODEN	31
2.1 MATERIAL	31
2.1.1 MAUSLINIEN	31
2.1.2 ZELLEN UND ZELLKULTURMEDIENTEN	31
2.1.3 CHEMIKALIEN	33

2.1.4	VERBRAUCHSMATERIALIEN	37
2.1.5	LABORAUSSTATTUNG	38
2.1.6	PUFFER UND LÖSUNGEN	40
2.1.7	KITS UND MARKER	43
2.1.8	OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	44
2.1.9	ERSTANTIKÖRPER	46
2.1.10	ZWEITANTIKÖRPER	47
2.2	METHODEN	48
2.2.1	MOLEKULARBIOLOGIE	48
2.2.1.1	RNA-Isolation	48
2.2.1.2	Erststrangsynthese (cDNA-Synthese)	48
2.2.1.3	Quantitative RT(Reverse Transkriptase)-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	48
2.2.1.4	DNA-Agarosegelelektrophorese	50
2.2.2	ZELLBIOLOGIE	51
2.2.2.1	Zellkultur	51
2.2.2.2	Medienwechsel und Passagierung	51
2.2.2.3	Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen	51
2.2.2.4	Isolierung primärer Lungenfibroblasten	52
2.2.2.5	Behandlung der Zellen mit TGF- β_1	53
2.2.3	PROTEINBIOCHEMIE	53
2.2.3.1	Proteinisolierung	53
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	54
2.2.3.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
2.2.3.4	Western-Blot und Immundetektion	56
2.2.3.5	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	57
2.2.3.6	Quantitative Collagenbestimmung durch „High-Pressure-Liquid-Chromatography“ (HPLC)	58
2.2.4	FUNKTIONELLE MESSMETHODEN	63
2.2.4.1	Kontraktionsassay	63
2.2.4.2	Messung des Zellwiderstands durch „Electric-Cell-substrate Impedance Sensing“ (ECIS)	64
2.2.4.3	Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration mit Fura-2	66
2.2.5	TIEREXPERIMENTELLE ARBEITEN	67
2.2.5.1	Intratracheale Instillation von Bleomycin bzw. PBS	67
2.2.5.2	Lungenfunktion	68

2.2.5.3	Bronchoalveoläre Lavage und Organ- bzw. Gewebeentnahme	69
2.2.5.4	Pulverisieren des Lungengewebes	70
2.2.5.5	Histochemie	70
2.2.6	AUSWERTUNG UND STATISTIK	73
3	ERGEBNISSE	74
3.1	VERGLEICH VON WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN MÄUSEN IN EINEM IN-VIVO MODELL DER EXPERIMENTELLEN LUNGENFIBROSE	74
3.1.1	EXPRESSION DES TRPC6-KANALS IN WT UND TRPC6-DEFIZIENTEN LUNGEN	74
3.1.2	GEWICHTSVERLAUF UND ÜBERLEBENSRATE VON WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN MÄUSEN	75
3.1.3	LUNGENFUNKTIONSMESSUNGEN	77
3.1.4	IMMUNOHISTOLOGIE DER LUNGENGeweBE	80
3.1.5	ANALYSE DER GENEXPRESSION IN DEN GESAMTLUNGEN NACH BEHANDLUNG MIT BLEOMYCIN ODER PBS	82
3.1.6	KOLLAGENEXPRESSION IN DEN LUNGEN VON BLEOMYCIN/PBS-BEHANDELTEN WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN MÄUSEN	84
3.2	FUNKTIONELLE ANALYSE DES TRPC6-KANALS IN ISOLIERTEN MURINEN PRIMÄREN LUNGENFIBROBLASTEN WÄHREND DER MYOFIBROBLASTEN-DIFFERENZIERUNG	85
3.2.1	IDENTIFIZIERUNG VON PRIMÄREN MURINEN LUNGENFIBROBLASTEN (pMLF)	86
3.2.1.1	Genexpression in WT- und TRPC6-defizienten pMLFs	86
3.2.1.2	Immunfluoreszenzfärbung von WT- und TRPC6-defizienten pMLFs	87
3.2.2	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER PRIMÄREN WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN LUNGENFIBROBLASTEN	93
3.2.2.1	Morphologie der WT- und TRPC6-defizienten pMLF	93
3.2.2.2	Genexpressionsmuster der TRPC-Kanäle in WT- und TRPC6-defizienten pMLF	94
3.2.3	TRPC6-FUNKTION IN pMLF WÄHREND DER TGF- β_1 -INDUZIERTEN MYOFIBROBLASTEN-TRANSFORMATION	95
3.2.3.1	Nachweis der TGF- β_1 -induzierten Myofibroblasten-Transformation mittels der quantitativen RT-PCR von mRNAs der Zielgene	95
3.2.3.2	Analyse der TRPC6-Expression in pMLF nach Applikation von TGF- β_1	96
3.2.3.3	Nachweis von Proteinmarkern für die TGF- β_1 -induzierte Myofibroblasten-Transformation mittels Western Blot	97
3.2.4	FUNKTIONELLE ANALYSE DER TGF- β_1 -INDUZIERTEN MYOFIBROBLASTEN-TRANSFORMATION VON FIBROBLASTEN	99
3.2.4.1	Nachweis von Aktinstressfaserbildung mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin	99

3.2.4.2	TRPC6-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom in TGF- β_1 -behandelten Lungenfibroblasten	101
3.2.4.3	TGF- β_1 -vermittelte Änderung der Lokalisation des Transkriptionsfaktors „nuclear factor of activated T-cells (NFAT)“ in WT und TRPC6-defizienten Fibroblasten	103
3.2.4.4	Rolle des TRPC6-Kanals für die TGF- β_1 -induzierte Erhöhung der Barrierefunktion von pmLF	105
3.2.4.5	Kontraktionsassay	106
4	DISKUSSION	108
4.1	ROLLE DES TRPC6-KANALS WÄHREND DER AUSBILDUNG EINER EXPERIMENTELLEN LUNGENFIBROSE (<i>IN VIVO</i>)	109
4.1.1	EVALUATION DES VERWENDETEN MAUSMODELLS	109
4.1.2	ERGEBNISSE DES VERGLEICHES VON WILD-TYP- UND TRPC6-DEFIZIENTEN MÄUSEN IM BLEOMYCIN-INDUZIERTEN LUNGENFIBROSEMODELL	111
4.2	ROLLE DES TRPC6-KANALS IN LUNGENFIBROBLASTEN (<i>IN VITRO</i>)	112
4.2.1	ISOLATION DER PMLF UND IDENTIFIZIERUNG DER ZELLEN	112
4.2.2	NACHWEIS DER FIBROBLASTEN-MYOFIBROBLASTEN-TRANSFORMATION IN PMLF NACH TGF- β_1 -BEHANDLUNG UNTER BETEILIGUNG DES TRPC6-KANALS	113
4.2.3	TRP-KANÄLE WÄHREND DER MYOFIBROBLASTEN-TRANSFORMATION	115
5	FAZIT UND AUSBLICK	117
	ANHANG	118
	TABELLENVERZEICHNIS	118
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	119
	LITERATURVERZEICHNIS	122
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	134
	DANKSAGUNG	135

Abkürzungsverzeichnis

A

α SMA	α glattes Muskelaktin
AECI	alveoläre Epithelzellen TypI
AECII	alveoläre Epithelzellen TypII
aHPV	akute Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion
APS	Ammoniumpersulfat
AUC	<i>engl. Area under the Curve</i>

B

BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BDM	2,3-Butandionmonoxim/Myosin-ATPase-inhibitor
Bleo	Bleomycin
BSA	Kälber Serum Albumin

C

Ca^{2+}	Calcium
cDNA	<i>engl. komplementäre DNS</i>
cm	Zentimeter
Coll1 α 1	Kollagen Typ1 α 1
CPC	Comprehensive Pneumology Center
Ctrl	Kontrolle
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4

D

d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

E

ECIS	Electric-Cell-substrate Impedance Sensing
EDA	Extra-Domain A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-to-Mesenchymal-Transition
EndoMT	Endothelial-to-Mesenchymal-Transition

ER
ERS
etc.
EZM

Endoplasmatischen Retikulum
European Respiratory Society
et cetera
Extrazelluläre Matrix

F

F-Aktin
FCS
FFA
FITC
Fn1
FSGS
Fura-2AM

filamentöses Aktin
engl. Fetal Calf Serum/Bovine Kälberserum
Flufenamat
Fluorescein
Fibronectin 1
Fokale Segmentale Glomerulosklerose
Fura-2-acetoxymethylester

G

GPCR
G_q

G-Protein-gekoppelter Rezeptor
Phospholipase C-gekoppeltes G-Protein

H

h
HBSS
HCl
HE
HEK293T
HEPES
HPLC
HPRT
HPV
HRCT
HRP

HYP

Stunde
engl. Hank's Balanced Salt Solution
Salzsäure
Hämatoxylin & Eosin
humane embryonale Nierenzellen
4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion
hochauflösende Computertomographie
engl. horseradish peroxidase/
Meerrettichperoxidase
Hydroxyprolin

I

i.p.
IC₅₀
IL-1 β
IL-6
ILD
IP₃
IP₃-R
IPF

intraperitoneal
mittlere inhibitorische Konzentration
Interleukin 1 β
Interleukin 6
interstitielle Lungenerkrankung
Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP₃-Rezeptor
engl. idiopathic pulmonary fibrosis/idiopathische
Lungenfibrose

K

kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm

L

LIRE	<i>engl. lung-ischaemia-reperfusion-induced edema</i>
------	---

M

M	Molar
mA	Milliampere
MEF	murinen embryonalen Fibroblasten
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	<i>engl. messenger RNA</i>

N

n	Anzahl der Proben
Na ⁺	Natrium
NBD-Cl	4-Chlor-7-Nitrobenzofurazan
NFAT	<i>engl. Nuclear Factor of activated T-Cells</i>
NFATc1	Isoform c1 des NFAT
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminal

O

OAG	1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
-----	-------------------------------

P

p	Signifikanzniveau
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1/ Serpin Typ1
PBS	<i>engl. Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	Phosphate Buffered Saline mit Tween20

PC
PCR
PDGF

PF
PFA
PI
PIP₂
PLC
pmLF
pmol
Prof.
PureCol®
PVDF

Q

qPCR
qRT-PCR

R

R²
RIPA
RNA
ROCE
RT

S

s
SDS
SDS-PAGE

SEM

SOCE
sog.
STIM

T

TEMED
TGF- β_1
TNF α
Tris
TRITC
TRP
TRPA

Computer
Polymerase Kettenreaktion
engl. Platelet derived Growth Factor/
Wachstumsfaktor
engl. pulmonary fibrosis/Lungenfibrose
Paraformaldehyd
Phosphatase-Inhibitor
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Phospholipase C
primäre murine Lungenfibroblasten
Picomol
Professor
engl. purified bovine Collagen solution
Polyvinylidenfluorid

quantitative Polymerase Kettenreaktion
quantitative Reverse Transkriptase-PCR

Bestimmtheitsmaß der Gerade
engl. RadioImmunoPrecipitation Assay
engl. Ribonuclein acid/Ribonukleinsäure
Rezeptor-Operierten-Ca²⁺-Einstrom
Raumtemperatur

Sekunde
Natriumlaurylsulfat
engl. Sodiumdodecylsulfate-
Polyacrylamidegelectrophoresis/Natriumlauryl-
sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
engl. standard error of the mean/Standardfehler
des Mittelwertes
Speicher-Operierte-Ca²⁺-Einstrom
sogenannt
engl. stromal interaction molecule

Tetramethylethylendiamin
engl. Transforming Growth Factor- β_1
Tumornekrosefaktor α
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
Transient Rezeptor Potential
Transient Rezeptor Potential vom Ankyrin-Typ

TRPC	klassischer bzw. canonical Transient Rezeptor Potential
TRPC6	Klassischer Transient Rezeptor Potential 6
TRPC6-/-	TRPC6-defizient
TRPM	Transient Rezeptor Potential vom Melastatin-Typ
TRPML	Transient Rezeptor Potential vom Mucolipin-Typ
TRPP	Transient Rezeptor Potential vom Polycystin-Typ
TRPV	vanilloid Transient Rezeptor Potential

U

UV	UV-Strahlung
UV-DAD	UV-Diodenarraydetektor

V

V	Volt
v.a.	vor allem

W

WT	Wildtyp
----	---------

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

Sonstige

ΔP	Differenz des Drucks
ΔV	Differenz des Volumens
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	intrazelluläres Calcium
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

Zusammenfassung

Die idiopathische Lungenfibrose (IPF; *engl. Idiopathic pulmonary fibrosis*) ist die häufigste und schwerwiegendste Form der interstitiellen Lungenerkrankungen mit unbekannter Ursache und führt in der Regel innerhalb von 3-5 Jahren nach Diagnose zum Tod. Charakteristisch für IPF ist eine übermäßige Produktion an extrazellulärer Matrix (z.B. Kollagen und α -glattes Muskelaktin) was zu einer Veränderung der Lungenarchitektur und zur Einschränkung der Lungenfunktion führt. Trotz der Markteinführung von Pirfenidon (Esbriet®) und Nintedanib (OFEV®) für die Behandlung von IPF stellt eine Lungentransplantation immer noch die einzige lebensrettende Maßnahme dar.

Nach heutigem Wissensstand wird der pathologische Prozess bei der Ausbildung einer Lungenfibrose durch eine unkontrollierte Wundheilung vorangetrieben. Beteiligt an diesen Vorgängen ist das Zytokin TGF- β_1 (Transforming Growth Faktor- β_1), das die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induziert. Die exakten Mechanismen der Entstehung und des Verlaufs einer Lungenfibrose sind bis heute noch unklar, weshalb die Erforschung und das bessere Verständnis der Krankheit und deren Entstehung dabei helfen könnte diese in Zukunft optimal therapieren und eventuell heilen zu können.

Der TRPC6 (*engl. Classical Transient Receptor Potential Channel 6*) ist ein für Ca^{2+} und Na^+ permeabler Kationenkanal, der für die Wundheilung in primären Herz- (Ratte) und humanen Haut-Fibroblasten essentiell ist, sowie an der Myofibroblasten-Differenzierung beteiligt ist.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Rolle des TRPC6-Ionenkanals während der Ausbildung einer Lungenfibrose nach Applikation des Zytostatikums Bleomycin und während der Differenzierung von Lungenfibroblasten durch TGF- β_1 untersucht. Hierfür wurden molekularbiologische- und zellbiologische Verfahren sowie Tiermodelle verwendet. Die Bleomycin-behandelten TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-})-Mäuse waren teilweise vor der Ausbildung einer Lungenfibrose geschützt, was sich in einer geringeren Mortalität, einer besseren Lungenfunktion und einer verminderten Kollagenproduktion im Vergleich zu den Wildtyp(WT)-Tieren äußerte. Auf zellulärer Ebene konnte nach Behandlung mit TGF- β_1 ein signifikanter Anstieg der TRPC6-Expression nur in primär isolierten Lungenfibroblasten (pmLF)

aus WT-Tieren nachgewiesen werden, was zu einer erhöhten Ausbildung von Aktinstressfasern, einer verstärkten Kontraktion und einem Anstieg im Zellwiderstand führte.

Abschließend lässt sich sagen, dass der TRPC6-Kanal eine wichtige Rolle bei der TGF- β_1 -induzierten Myofibroblastendifferenzierung während der Ausbildung einer Lungenfibrose spielt. Die Evaluation spezifischer TRPC6-Inhibitoren könnte daher in Zukunft neue Therapieoptionen für Patienten mit Lungenfibrose aufzeigen.

Summary

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is the most common and most severe form of the idiopathic interstitial lung diseases of unknown reasons leading to death within 3-5 years. A characteristic feature for IPF is an excessive production of extracellular matrix (e.g. collagen and α -smooth muscle actin) which destroys lung architecture and leads to respiratory failure. Despite recent approval of pirfenidone (Esbriet®) and nintedanib (OFEV®) as therapeutic options, the only curative treatment of IPF is still lung transplantation.

The pathological process of pulmonary fibrosis (PF) is driven by an impaired wound healing involving fibroblasts and myofibroblasts. Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) induces the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts. However, the exact mechanism of the development and progress of IPF are still elusive. Research for a better understanding of this disease will help for a better treatment and cure of the disease in the future.

TRPC6 (Classical Transient Receptor Potential 6), an unselective Na^+ and Ca^{2+} permeable cation ion channel, promotes myofibroblast differentiation during wound healing in primary cardiac and human dermal fibroblasts. To study a potential role of TRPC6 in the development of PF lung function, gene and protein expression were analyzed in wildtype (WT) and TRPC6-deficient (TRPC6^{-/-}) mice utilizing a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. WT mice showed a higher mortality while TRPC6-deficient mice were partially protected from fibrosis as a consequence of a lower production of collagen and almost normal lung function after the application of bleomycin. On a cellular level TGF- β_1 induced TRPC6 expression only in WT primary murine lung fibroblasts (pmLF) resulting in higher stress fiber formation, augmented contraction rates and increased cellular resistance, which was attenuated in TRPC6-deficient pmLFs.

To conclude, TRPC6 is an important determinant for TGF- β_1 induced myofibroblast differentiation during PF. Evaluating specific TRPC6-inhibitors might be beneficial for the treatment of IPF in the future.

1 Einleitung

Physiologische und pathophysiologische Prozesse in vielzelligen Organismen werden über extrazelluläre Botenstoffe (sog. „second messenger“; z.B. Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und Ionen) koordiniert. Sobald eine Zelle entsprechende Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimiert, kann sie so mit anderen Zellen kommunizieren und entsprechend auf die Botenstoffe reagieren indem eine Signaltransduktionskaskade initiiert wird. Die Zelle reagiert nun organ- bzw. systemspezifisch durch Proliferation, Kontraktion, Differenzierung, Migration oder auch durch Zelltod (Berridge et al. 2000).

Der pathologische Prozess bei der Ausbildung einer Lungenfibrose wird durch eine unkontrollierte Wundheilung vorangetrieben, initiiert v.a. durch den Botenstoff TGF β_1 (Fernandez et al. 2012). Trotz großer Fortschritte in der Aufklärung des Pathomechanismus sind die exakten Mechanismen und die Ursachen für die Entwicklung einer Lungenfibrose bis heute noch unklar.

1.1 Die Idiopathische Lungenfibrose

1.1.1 Definition

Die idiopathische Lungenfibrose (engl. idiopathic pulmonary fibrosis/IPF) ist die häufigste Form der interstitiellen Lungenerkrankungen mit noch weitgehend unbekannter Ursache. Die Krankheit verläuft chronisch progressiv, ist beschränkt auf die Lunge, irreversibel und tritt vor allem bei älteren Menschen (>50 Jahre) auf. Charakteristisch für die IPF ist eine zunehmende Atemnot und Kurzatmigkeit (Dyspnoe), eine Abnahme der Lungenfunktion und eine schlechte Überlebensprognose (King et al. 2011, Raghu et al. 2011).

1.1.2 Epidemiologie

An der IPF erkranken beide Geschlechter, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (King et al. 2011). Die Inzidenz der Erkrankung (also die Anzahl der Neuerkrankungen) nimmt mit zunehmenden Alter zu, während Patienten unter 50 Jahren eher selten betroffen sind (Raghu et al. 2011). Laut einer Veröffentlichung der European Respiratory Society (ERS) im Jahr 2016 liegen die Einschätzungen für

Europa und die USA bei einer Zahl von jährlich 65.000 Neuerkrankungen mit einer Mortalität von 17.000 Patienten (ERS Monography 2016).

Mit einer mittleren Überlebensrate von durchschnittlich drei Jahren nach Diagnose (King et al. 2011) ist IPF die interstitielle Lungenerkrankung mit der schlechtesten Prognose. Die IPF kann langsam progressiv verlaufen, es können aber auch akute Exazerbationen (Krankheitsschübe) auftreten, die die Prognose deutlich verschlechtern. Unterschiedliche Verläufe der IPF prägen daher das Bild.

Abbildung 1 zeigt schematisch die unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen der IPF.

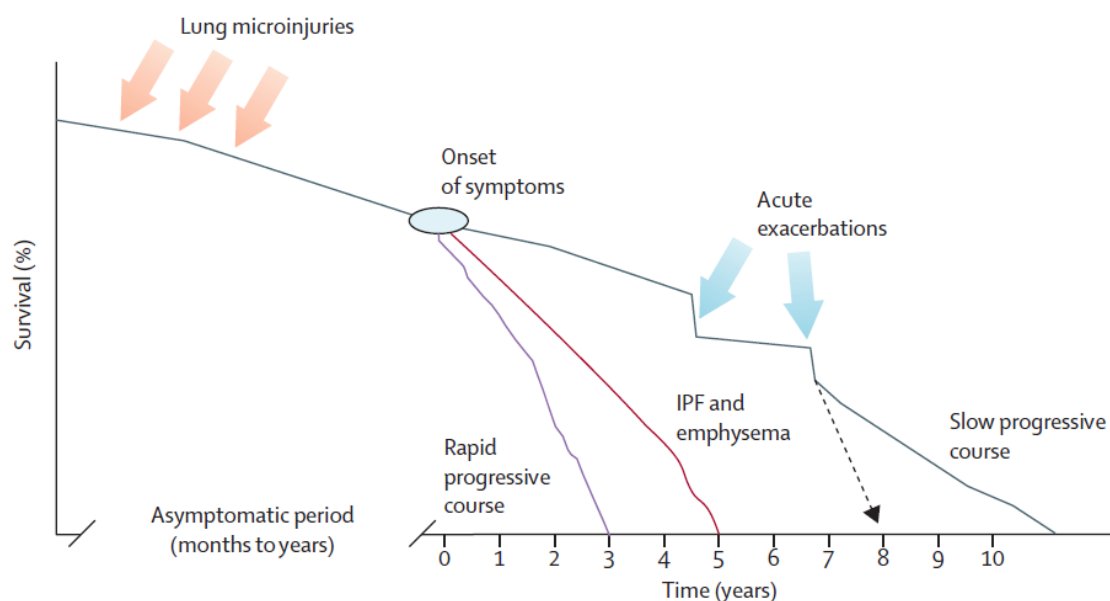


Abbildung 1: Klinische Verlaufsformen und Überlebensrate („survival %“) der IPF. Die Erkrankung zeigt einen sehr langen (Monate bis Jahre) asymptomatischen Verlauf („asymptomatic period“) bei dem es zu wiederholten kleinen Verletzungen („Lung microinjuries“) des Lungengewebes kommt. Nach dem Auftreten erster Symptome („Onset of symptoms“) und der Diagnose kommt es zu sehr unterschiedlichen Verläufen. Nur wenige Patienten erleiden einen sehr schnellen progressiven Verlauf („rapid progressive course“). Bei den meisten Patienten verläuft die Erkrankung langsam mit einer beständigen Verschlechterung („slow progressive course“). Das Auftreten von akuten Exazerbationen („acute exacerbations“) kann tödlich enden oder den Patienten in einem deutlich schlechteren Zustand zurücklassen. Bei starken Rauchern kann es zu einem zusätzlichen Lungenemphysem kommen, was die Mortalität im Vergleich zur reinen IPF erhöht. (Abbildung aus King et al. 2011)

1.1.3 Risikofaktoren

Eine ganze Reihe von Gasen, Dämpfen aber auch Aerosole unterschiedlichster Gefahrstoffe stehen im Verdacht die Lunge mit der Zeit zu schädigen und so einen fibrösen Umbau des Lungengewebes zu provozieren. Schadstoffe, wie z.B. Asbest, Quarzstaub (Steinmetz) oder Holzstaub, die das Lungengewebe schädigen können, gelangen über die Atemwege in die Lunge. Der einzige jedoch zweifelsfrei nachgewiesene exogene Faktor, der eine Lungenfibrose verursachen kann, ist das Rauchen. Auch Grunderkrankungen wie gastroösophagealer Reflux, pulmonaler Bluthochdruck oder virale Infektionen (z.B. durch Epstein-Barr-Viren) können das Lungengewebe schädigen. Fibrotische Veränderungen in der Lunge können auch als Nebenwirkung von Medikamenten, wie z.B. Bleomycin oder Amiodaron, hervorgerufen werden. Überdies kann auch eine genetische Komponente nicht ausgeschlossen werden. (Loomis-King et al. 2013, King et al. 2011, Raghu et al. 2011)

1.1.4 Pathologie der idiopathischen Lungenfibrose

Bei der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) kommt es aus ungeklärter Ursache (idiopathisch) zur Vernarbung (Fibrose) des Lungengewebes. Hierbei führt eine anormale Wundheilung mit einer erhöhten Produktion von extrazellulärer Matrix (z.B. Fibronectin, α -glattes Muskelaktin und Kollagen) zu einer Vermehrung des Bindegewebes im Organ. Die IPF zählt zu den interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD), d.h. die Vernarbung und Verdickung erfolgt im bindegewebigen Stützgerüst und in den Zellzwischenräumen (Interstitium) und ist auf die Lunge beschränkt. Die krankhafte Vermehrung des Bindegewebes zwischen Lungenbläschen und Blutgefäßen führt zu einer verhärteten und vernarbten Lungenstruktur. Diese Funktionseinschränkung lässt den Sauerstoff schlechter zu den Blutgefäßen gelangen. Es kommt zu einer Störung des Gasaustausches und letztlich werden die Organe des Körpers nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Zusätzlich verliert die Lunge an Dehnbarkeit wodurch sie mehr Kraft während der Atemarbeit aufbringen muss (Verschlechterung der Lungenfunktion) um die Sauerstoffversorgung dennoch gewährleisten zu können. Der Patient ist zunächst stark beeinträchtigt und die unzureichende Sauerstoffversorgung führt letztendlich zum Tod.

In **Abbildung 2** ist schematisch der makro- und mikroskopische Aufbau einer gesunden (links) und einer fibrotischen Lunge (rechts) dargestellt. Makroskopisch ist zu sehen, dass sich die fibrösen Veränderungen des Lungengewebes heterogen über die Lunge verteilen und vor allem in den basalen und peripheren Lungenabschnitten auftreten. Mikroskopisch ist die Einwanderung von peripheren Fibroblasten und die Ausbildung von sog. Fibroblasten-Foci (fleckig verteilte Ansammlung von Fibroblasten) im Interstitium deutlich zu sehen. Auch die Verdickung der Septen und die für die IPF typische Honigwabenstruktur sind gut zu erkennen.

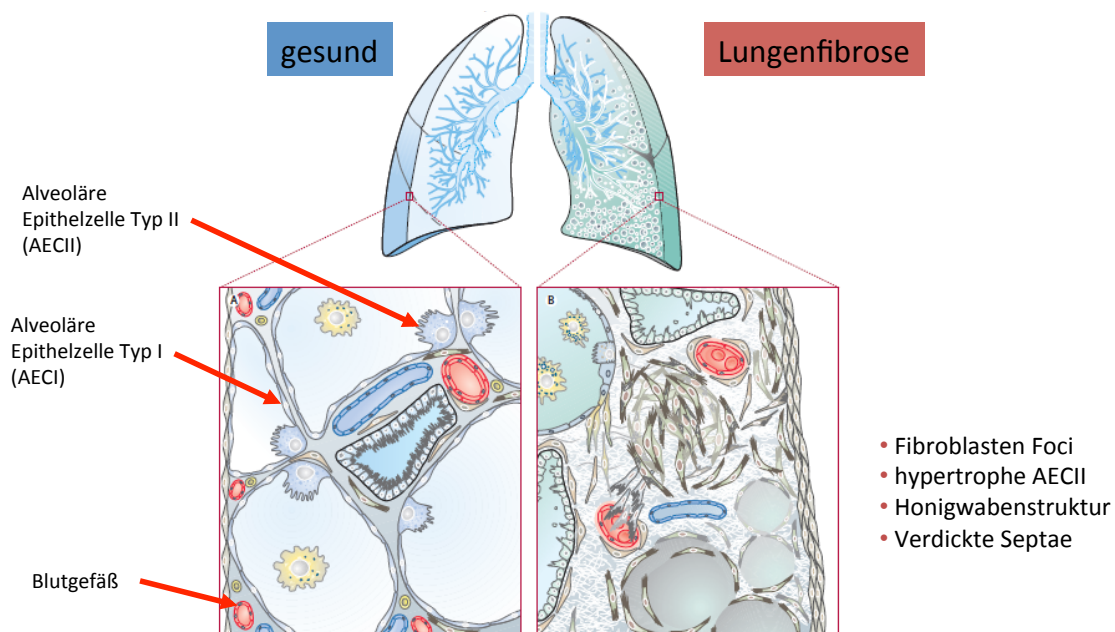


Abbildung 2: Schemata zum klinischen Erscheinungsbild der Lungenfibrose. Beschreibung siehe Text.
(Abbildung modifiziert aus Fernandez et al. 2012)

1.1.4.1 Pathomechanismus

Der exakte Mechanismus und die Ursachen für die Ausbildung einer idiopathischen Lungenfibrose sind bis heute noch nicht genau verstanden. Ursprünglich wurde eine Entzündung als Ursache für die Verletzung der Epithelzellschicht vermutet. Jedoch zeigte der Einsatz von verschiedensten antiinflammatorischen Medikamenten, v.a. Kortikosteroide, keine Wirkung auf das Fortschreiten der Lungenfibrose (Selman et al. 2001, Scotton et al. 2007).

Heute weisen immer mehr Daten darauf hin, dass die fibrösen Veränderungen aufgrund wiederholter Mikroverletzungen der alveolären Epithelzellschicht erfolgen

(King et al. 2011, Selman et al. 2001 und Hinz et al. 2012). Als Folge der wiederholten Verletzungen des Gewebes kommt es zu einer aberranten Wundheilung an der aktivierte Fibroblasten, die sog. Myofibroblasten, beteiligt sind. Vor allem die Myofibroblasten sammeln sich fleckig an und führen zu den sogenannten Fibroblasten- und Myofibroblasten-Foci. Dort produzieren sie vermehrt extrazelluläre Matrix (EZM), darunter v.a. Kollagen Typ1a1, α -glattes Muskelaktin und Fibronektin, was den Bindegewebsanteil im Interstitium erhöht und letztendlich die Zerstörung der Lungenarchitektur zur Folge hat (King et al. 2011, McNulty 2007, Scotton et al. 2007, Hinz 2007).

Die verletzten Epithelzellen sezernieren das Chemokin CXCL12 (der Ligand für den CXCR4-Rezeptor auf humanen Fibrozyten) um die zirkulierenden Fibrozyten an die verletzte Stelle zu locken. Zusätzlich schütten Epithelzellen den Wachstumsfaktor PDGF (Platelet Derived Growth Factor) aus, der vorhandene Fibroblasten anzieht, und den profibrotischen Faktor TGF- β , der die Differenzierung zu Myofibroblasten aus verschiedensten Zellen induziert (King et al. 2011). Zu diesen gehören residente Fibroblasten (Hung et al. 2013), alveoläre Epithelzellen TypI und TypII (AECI und AECII; Epithelial-to-Mesenchymal-Transition/EMT; Kim et al. 2006, Tanjore et al. 2011), Fibrozyten (Hashimoto et al. 2004), Perizyten (Hung et al. 2013) und pleurale Mesothelzellen (Mubarak et al. 2012). **Abbildung 3** stellt die Bildung der Myofibroblasten-Foci schematisch dar:

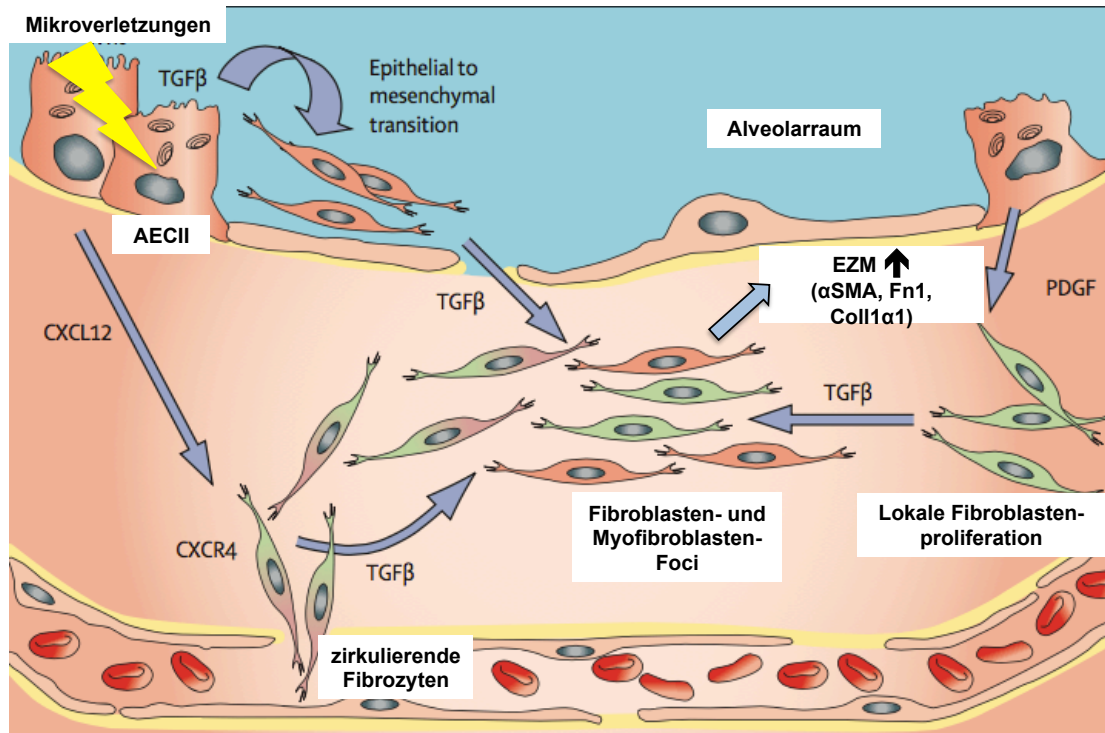


Abbildung 3: Übersicht über den Ursprung der Fibroblasten während der IPF. Mikroverletzungen induzieren die Sekretion von CXCL12, PDGF und TGF- β aus den alveolären Epithelzellen TypII (AECII). CXCL12 lockt die zirkulierenden Fibrozyten an während PDGF Fibroblasten aus der Umgebung anzieht. TGF- β löst die Einwanderung der AECII ins Mesenchym aus (EMT/Epithelial-to-Mesenchymal-transition) und induziert die Differenzierung zu Myofibroblasten. Die sogenannten Myofibroblasten-Foci, produzieren vermehrt Extrazelluläre Matrix (EZM) und versteifen somit das Lungengewebe. α SMA= α glattes Muskelaktin; Fn1= Fibronektin; Coll1 α 1= Kollagen Typ1 α 1 (Abbildung modifiziert nach King et al. 2011)

1.1.4.2 Lungenfibroblasten

Fibroblasten, die zur Gruppe der mesenchymalen Zellen gehören, sind flach und spindelförmig. Sie befinden sich im bindegewebartigen Stützgerüst in den Geweben und Organen des Körpers und spielen eine wichtige Rolle während der Synthese und Homöostase der meisten Komponenten der Extrazellulären Matrix (EZM; zu denen Proteine wie z.B. Kollagen, Fibronektin, Proteoglykane und Tenascin gehören). Als Hauptproduzenten der EZM sind Fibroblasten für die Zusammensetzung des Gewebes verantwortlich. Sie produzieren auch Metallomatrixproteasen (MMPs), die den Abbau der EZM regulieren und somit die EZM-Homöostase beeinflussen. Durch die Regulation und Synthese der EZM-Komponenten, gerade während des Prozesses der Wundheilung, wird den Fibroblasten eine Schlüsselrolle während der Gewebeheilung und des -umbaus zugeschrieben. (Baum et al. 2011, McAnulty 2007, Phan 2008)

Anders als für die meisten anderen Zelltypen in der Lunge gibt es für Fibroblasten keinen spezifischen Zellmarker, was dafür spricht, dass Fibroblasten keine homogene Zellpopulation sind, sondern eher eine Ansammlung verschiedener Subpopulationen (Phan 2008). Sie werden hauptsächlich über ihre spindelförmige Morphologie identifiziert.

Aktivierte Fibroblasten und Myofibroblasten

Zu den Hauptcharakteristika in der Pathologie der IPF zählen die exzessive Ansammlung von Fibroblasten, die Ausbildung von Fibroblasten-Foci (sog. Fibroblastenherde) im Lungeninterstitium und eine übermäßige Produktion von extrazellulärer Matrix.

Die **exzessive Ansammlung an Fibroblasten** resultiert hauptsächlich aus der gesteigerten Proliferationsrate und der erworbenen Apoptoseresistenz der aktivierten Fibroblasten. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass aus IPF-Patienten isolierte Fibroblasten eine höhere Proliferationsrate besitzen (Nho et al. 2011) und sich der - über den Fas-Ligand induziert - Apoptose widersetzen können (Maher et al. 2010). Desweiteren belegen immer mehr Studien, dass die aktivierten Fibroblasten bzw. Myofibroblasten über die Transdifferenzierung aus unterschiedlichsten Zellarten entstehen. Das profibrotische Zytokin TGF- β 1 induziert die Differenzierung der vorhandenen Fibroblasten zu Myofibroblasten (Hung et al. 2013), die eine Zwischenform zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen sind. Aber auch alveolären Epithelzellen (durch die sog. EMT, „epithelial-to-mesenchymal-transition“; Kim et al. 2006, Tanjore et al. 2011) oder Endothelzellen (sog. EndoMT, „endothelial-to-mesenchymal-transition“; Montorfano et al. 2014) können sich zu Myofibroblasten transformieren. Diese differenzierten Zellen synthetisieren und sezernieren nun vermehrt extrazelluläre Matrix (Kollagen, Fibronectin, α SMA; genauere Beschreibung siehe unten) und wandern ins Lungengewebe ein. Aktuelle Studien zeigen neben den Fibroblasten, den Epithel- und Endothelzellen auch noch viele andere Zellarten, die ins Lungengewebe einwandern und zu Myofibroblasten differenzieren. Hierzu zählen zum Beispiel Perizyten (Hung et al. 2013) und pleurale Mesothelzellen (Mubarak et al. 2012). Die verschiedenen zellulären Ursprünge für Myofibroblasten sind in **Abbildung 4** schematisch dargestellt.

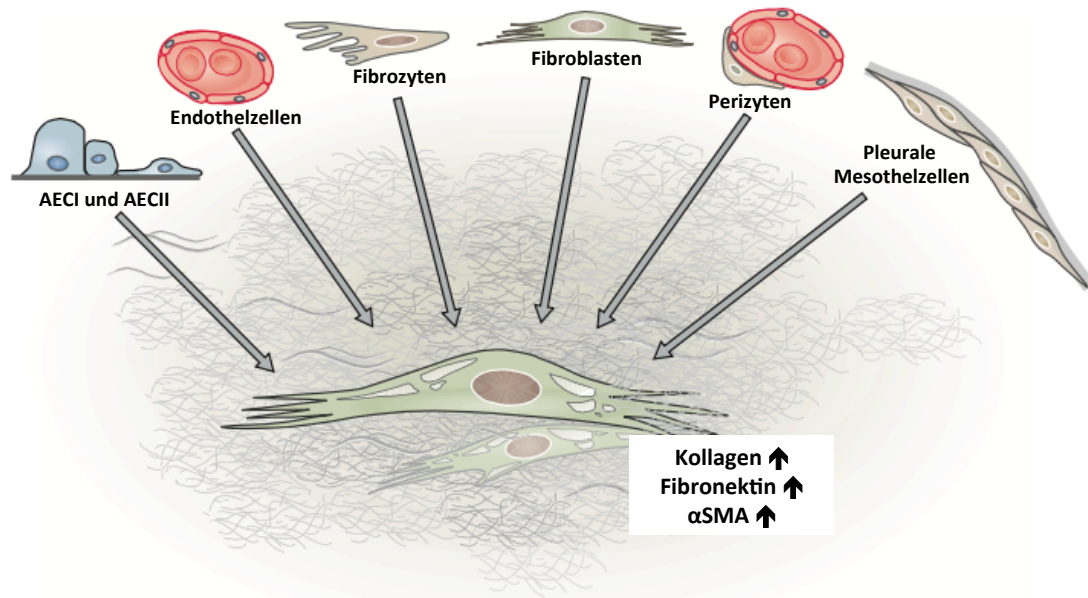


Abbildung 4: Schematische Darstellung der verschiedenen zellulären Ursprünge für Myofibroblasten während der Ausbildung einer IPF. Es wird vermutet, dass viele verschiedene Zelltypen als Ursprung für aktivierte Fibroblasten und Myofibroblasten in den Fibroblasten-Foci dienen können. AECI: alveoläre Epithelzellen TypI; AECII: alveoläre Epithelzellen TypII (modifiziert nach Fernandez et al. 2012)

Fibroblasten-Foci sind Ansammlungen von aktiv-proliferierenden Myofibroblasten mit einer hohen Syntheserate vor allem an Kollagen (Katzenstein et al. 1998, Cool et al. 2006). Seit ihrer Entdeckung 1988 (Myers et al. 1988) ist inzwischen klar, dass diese Foci - meist in der Übergangszone zwischen gesundem und fibrotischem Lungengewebe - bedeutend für den Fortlauf der Erkrankung sind und ihre Anzahl direkt mit der Progression und dem Überleben eines IPF-Patienten korreliert (Nicholson et al. 2002).

Lange Zeit wurden die Fibroblasten-Foci als isolierter, aberranter Wundheilungsprozess in Folge einer sich wiederholenden, lokalen Epithelzellschädigung angesehen (Selman et al. 2001). Cool et al. hingegen konnten 2006 zeigen, dass der Ursprung aus der Lungenperipherie stammt und sich das fibröse Netzwerk bis ins Lungengewebe ausbreitet (Cool et al. 2006).

Diese aberrante Ansammlung und Aktivierung der Fibroblasten im erkrankten Lungeninterstitium führt dann zu einer **exzessiven Produktion von EZM** während der Entwicklung einer IPF.

Extrazelluläre Matrix (EZM)

Die EZM ist ein komplexes, nicht-zelluläres Netzwerk aus hochgradig vernetzten Proteinen, das im Interzellularraum von allen Geweben und Organen vorkommt. Sie ist nicht nur die formgebende Komponente im Gewebe sondern auch verantwortlich für die Verankerung von den in ihr eingebetteten Zellen (Frantz et al. 2010).

Die EZM, die aus Wasser, Proteinen und Polysacchariden aufgebaut ist, enthält auch Enzyme, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren (Frantz et al. 2010) und wird von (Myo)Fibroblasten synthetisiert und sezerniert. Die Makromoleküle bilden untereinander ein riesiges Netzwerk und übernehmen in Abhängigkeit von dem entsprechenden Gewebe viele biologische Funktionen, wie zum Beispiel die Formgebung, Zelladhäsion und die mechanische Stabilität von Organen und Geweben. Aber auch Zellmigration und -proliferation sowie Auf-, Ab- und Umbau des Gewebes resultieren aus der Wechselwirkung zwischen EZM und Zellen.

Kollagen zum Beispiel ist das fibröse Protein, das am häufigsten in der interstitiellen EZM vorkommt. Es macht im multizellulären Organismus bis zu 30% des Gesamtproteins aus (Frantz et al. 2010). Das Kollagen besteht aus einzelnen, langen Proteinketten aus Glycin, Prolin und Hydroxyprolin (Ricard-Blum 2011). Drei dieser Kollagen-Helices arrangieren sich in einer Superhelix (sog. Tripelhelix), wobei die Helix über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Durch diese Anordnung besitzt das Kollagen eine enorme Zugfestigkeit und ist in der EZM für die Festigkeit des Gewebes zuständig. Die Hauptkollagene sind das interstitielle Kollagen TypI und TypIII (Frantz et al. 2010, Hynes et al. 2012, Klingberg et al. 2013).

Ein weiteres wichtiges fibröses Protein ist das **Fibronectin**. Das funktionelle Fibronectin ist ein Dimer aus Polypeptidketten, das von zwei Disulfidbrücken zusammengehalten wird (Klingberg et al. 2013). Es gibt verschiedene Spleiß-Varianten wobei das EDA-(„extra-domain-A“) Fibronectin für die TGF- β_1 -induzierte Myofibroblasten-Transformation nötig ist (Serini et al. 1998). Wichtigste Funktion des Fibronectins in der EZM ist die Zellverankerung und -migration während der Wundheilung (Frantz et al. 2010, Hynes et al. 2012, Klingberg et al. 2013).

Die EZM ist ein sehr dynamisches Kompartiment, das einem geordneten Auf- und Abbau unterliegt und in ständiger Interaktion mit den Zellen steht. Neben der Sekretion der EZM sind Fibroblasten auch die Hauptakteure beim Abbau der EZM-Moleküle, indem sie entsprechend EZM-abbauende Enzyme (wie z.B.

Metallomatrixproteinasen) produzieren (Overall 2002). Die Homöostase dieses dynamischen Prozesses der EZM-Produktion ist eine sehr komplexe Aufgabe, gerade während der Morphogenese aber auch während der Wundheilung. Kommt es nun zu einem Ungleichgewicht in der EZM-Homöostase resultiert daraus eine gestörte Wundheilung durch exzessive Sekretion von EZM aus aktivierten Fibroblasten (siehe oben). Neben Kollagen produzieren die aktivierten Fibroblasten nun vermehrt Fibronectin und Proteoglykane (McAnulty 2007). Hinzu kommt ein defekter Abbau der EZM-Komponenten durch die aktivierten Fibroblasten, der die EZM-Ausschüttung zusätzlich erhöht (Pardo et al. 2008). Letztlich resultiert daraus eine fibroproliferierende Erkrankung, wie zum Beispiel die IPF, mit einer zerstörten Organstruktur und eingeschränkter Organfunktion. (Klingberg et al. 2013, Frantz et al. 2010)

1.1.5 Symptome und Diagnose der IPF

Patienten mit IPF leiden an Dyspnoe (Atemnot) zunächst nur bei Belastung, später dann auch im Ruhezustand. Auch trockener, unproduktiver Husten, inspiratorisches Knisterrasseln und Trommelschlegelfinger (siehe **Abbildung 5**) zählen zu den Symptomen bei IPF (HelmholtzZentrumMünchen 2016).

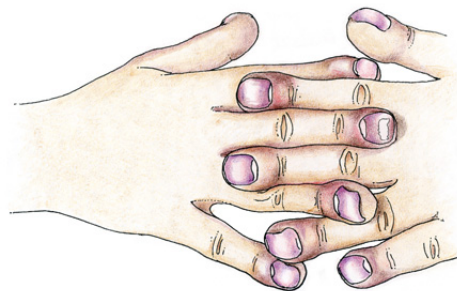


Abbildung 5: Trommelschlegelfinger. Durch den chronischen Sauerstoffmangel kommt es zur Ausbildung von verdickten Fingerspitzen (Trommelschlegel) und zu vergrößerten Fingernägeln (sog. Uhrglasnägel). (eesomAG 2016)

Die Diagnose ist nicht leicht zu stellen und erfordert die Zusammenarbeit mehrerer Spezialisten (HelmholtzZentrumMünchen 2016). Zunächst erfolgt ein ausführliches Anamnesegespräch über Häufigkeit und Art der Beschwerden und wann diese auftreten. Anschließend kommt es zur körperlichen Untersuchung mit Augenmerk auf die obengenannten Symptome und einer Lungenfunktionsmessung. Typisch für

die IPF ist eine allgemein oberflächliche und schnelle Atmung mit Problemen bei der Einatmung (restriktive Lungenerkrankung). Ein Röntgenbild (siehe **Abbildung 6**) und die hochauflösende Computertomographie (siehe mittleres Bild in **Abbildung 7**) der Lunge, als bildgebende Verfahren, zählen zu den wichtigsten diagnostischen Werkzeugen bei der Diagnose der IPF.

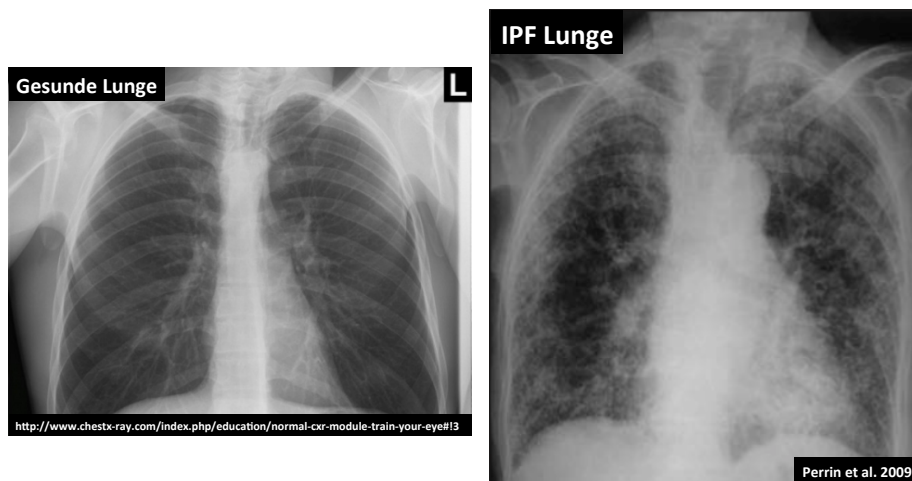


Abbildung 6: Röntgenbild einer gesunden und einer IPF Lunge. Das Röntgenbild der gesunden Lunge (links) zeigt eine intakte Lungenstruktur. Auf dem Bild der IPF-Lunge (rechts) ist die subpleurale, basale Trübung des Lungengewebes zu erkennen. (Abbildungen modifiziert nach ChestX-ray.com 2014 und Perrin et al. 2009)

Hier werden Veränderungen des Lungengewebes, wie die subpleurale und basale Prädominanz, netzförmige Transparenzminderungen, die Honigwabenstruktur und eine insgesamt zerstörte Lungenstruktur (Cavazza et al. 2010) sichtbar. **Abbildung 7** zeigt die Verteilung der fibrösen Veränderungen schematisch und an einem Beispielbild eines hochauflösenden Computertomographie (HRCT)-Bildes (siehe **Abbildung 7b**).

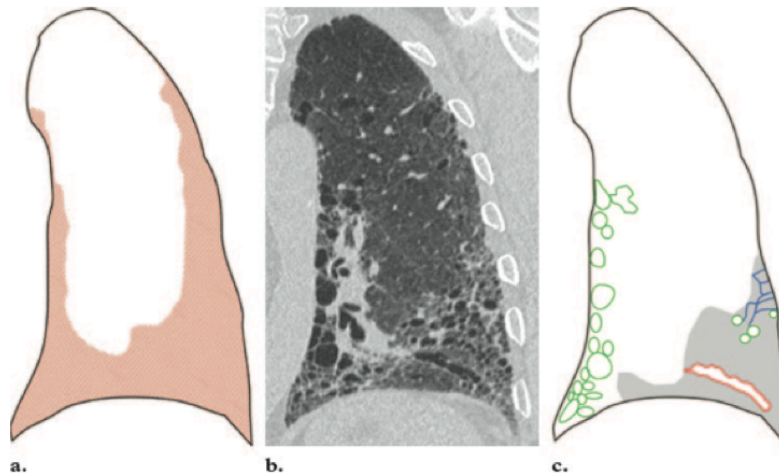


Abbildung 7: Verteilung der fibrösen Veränderungen während einer IPF. a) subpleurale, basale Prädominanz der fibrösen Veränderung (rote Fläche in a). b) HRCT-Bild eines IPF-Lungenflügels. c) HRCT-Muster schematisch dargestellt. Deutlich zu erkennen die Wabenstruktur (grün), retikuläre (netzförmige) Verdichtungen (blaue Flächen), Bronchiektasen (roter Bereich in c; Ausweitung des Bronchus) und die Transparenzverminderung (grauer Bereich in c). (Mueller-Mang et al. 2007)

1.1.6 Therapie der IPF

Eine einmal entstandene Vernarbung des Lungengerüsts kann nicht mehr rückgängig gemacht werden, weshalb eine Heilung der Lungenfibrose momentan nicht möglich ist.

Daher ist es Ziel der Therapie die Symptome zu lindern und den Krankheitsverlauf zu verzögern. Laut der Deutschen Leitlinie zur Diagnose und Therapie von IPF (Behr et al. 2013) sind zunächst die Auslöser, sofern bekannt, zu behandeln (z. B. Grunderkrankung, Medikamente, anorganische Stäube). Desweiteren wird eine Sauerstofftherapie als symptomatische Behandlung und eine Lungentransplantation bei geeigneten Kandidaten empfohlen. Zusätzlich können Komorbiditäten medikamentös behandelt werden, wie z.B. Kortison und Immunsuppressiva gegen die entzündliche Komponente. Jedoch sprechen IPF-Patienten meist nur vorübergehend darauf an (Selman et al. 2001).

Mit der Zulassung der Wirkstoffe Pirfenidon (Esbriet®; antifibrotisch und – inflammatorisch, hemmt die Synthese von TGF- β) im Jahr 2011 und Nintedanib (OFEV®; Tyrosin-Kinase-Inhibitor) im Jahr 2015 stehen uns nun zwei Medikamente zur Verfügung, welche den Verlauf der IPF nachweislich verzögern (Selvaggio et al. 2016). Beide verhindern eine Verschlechterung der Lungenfunktion und haben einen

positiven Effekt auf das Gesamtüberleben. Mit Ausnahme der Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden mit Diarrhö und bei Pirfenidon zusätzlich eine erhöhte Photosensibilität sind die beiden neuen Wirkstoffe gut verträglich. Ein direkter Vergleich der beiden Wirkstoffe steht noch aus, jedoch sind die Behandlungseffekte ungefähr vergleichbar und werden in weiteren Studien hinsichtlich ihrer Effekte auf fibrosierende Lungenerkrankungen, auf fortgeschrittene Krankheitsstadien und Kombinationsmöglichkeiten untersucht. (Behr et al. 2013, Nanthakumar et al. 2015, Fala 2015, Selvaggio et al. 2016)

1.2 Die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose als Tiermodell für die IPF

Es gibt verschiedene Methoden um in einem Tiermodell eine Lungenfibrose zu induzieren. Hierzu zählen Chemikalien (wie z.B. Bleomycin), die Überexpression von Wachstumsfaktoren (wie z.B. TGF- β , IL-1 β), Bestrahlung oder anorganische Partikel (z.B. Asbest, Quarz) (Moeller et al. 2006). In dieser Arbeit wurde die am häufigsten verwendete Methode, das intratracheale Bleomycin-Modell (Degryse et al. 2011), verwendet.

Bleomycin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum aus *Streptomyces verticillus* und wird als Zytostatikum bei verschiedenen Krebserkrankungen eingesetzt. Eine gravierende Nebenwirkung ist die Entwicklung einer Lungenfibrose, die bei manchen Patienten sogar tödlich endet. Bleomycin zeigt unterschiedliche Gewebespezifität, wobei diese abhängig von der Expression der sogenannten Bleomycin-Hydrolase ist (Takeda et al. 1996). Die Bleomycin-Hydrolase ist eine Aminopeptidase und kommt nur in spezifischen Geweben vor. In einem Gewebe das keine Bleomycin-Hydrolase besitzt, wie z.B. in der Lunge (Adamson 1976), kommt es somit zu einer Ansammlung von Bleomycin.

Durch die Induktion von Doppelstrangbrüchen in der DNA kommt es zur Einwanderung von Entzündungszellen und zur Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine (IL-1, TNF α , IL-6, Interferon- γ). Die anschließende Entwicklung der Fibrose ist charakterisiert durch profibrotische Marker wie das Zytokin TGF- β und extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin1 (Fn1) und Kollagen (Coll1 α 1) (Degryse et al. 2011).

Der zeitliche Ablauf der Entwicklung der Lungenfibrose ist abhängig von der Applikationsart (intratracheal oder systemisch: intravenös oder intraperitoneal) und der verwendeten Mauslinie. Bei einer einmaligen intratrachealen Bleomycinapplikation (siehe **Abbildung 8**) entwickelt sich die Fibrose innerhalb von zwei bis vier Wochen.

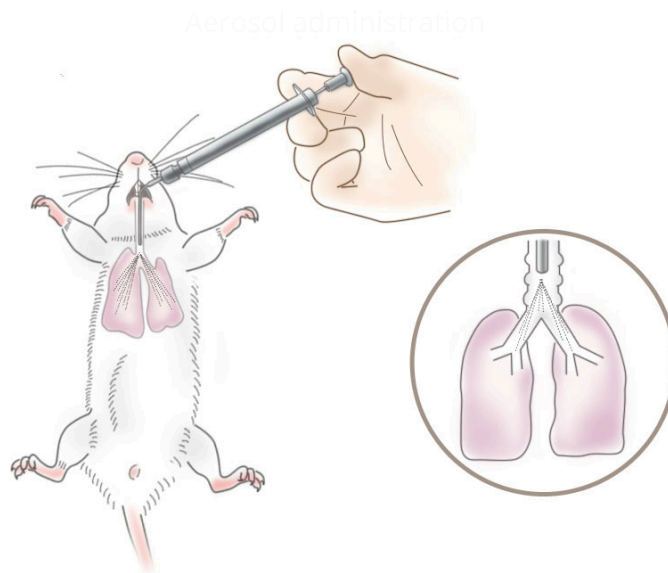


Abbildung 8: Schematische Darstellung der intratrachealen Bleomycin-Applikation. Durch die intratracheale Applikation und Vernebelung gelangt das Bleomycin bis zu den Lungenbläschen. (Abbildung aus EncapsulaNanoSciencesLLC 2014)

In der ersten Woche kommt es zu einer starken Entzündung. Ab Tag 7 setzt die Wundheilung und der fibrotische Umbau ein. Die Fibrose erreicht ihren Höhepunkt an Tag 14 und bleibt bis Tag 21 erhalten. Ab diesem Zeitpunkt löst sich die Fibrose wieder auf (ein Phänomen welches nur in der Maus vorkommt) (Degryse et al. 2011, Williams et al. 2016, Moore et al. 2013, Chaudhary et al. 2006).

Das Bleomycin-Modell ist eine gut-etablierte Methode, bei der sich die Fibrose schnell und sehr gut reproduzierbar entwickelt. Das histologische Bild der Fibrose ist dem der humanen Fibrose sehr ähnlich (heterogen verteilte parenchymale Entzündung, Epithelzellschädigung mit Hyperplasie und eine interstitielle Fibrose) (Moeller et al. 2006). Nachteile dieser Methode sind zwei Faktoren, die beim Menschen nicht auftreten: Die Reversibilität der entwickelten Lungenfibrose und die initial auftretende Entzündung. Im Menschen vermutet man die Ursache der Lungenfibrose in einer gestörten Wundheilung. (Degryse et al. 2011, Mouratis et al.

2011, Moeller et al. 2006, Moore et al. 2013, Williams et al. 2016, Agostini et al. 2006)

1.3 TRP-Kanäle

Transient Receptor Potential (TRP)-Proteine sind membranständige Ionenkanäle, welche unselektiv durchlässig für ein- und mehrwertige Kationen sind (zusammengefasst in Venkatachalam et al. 2007). Kanalproteine sind extrem wichtig für das Überleben und die Funktion einer jeden Zelle. Diese porenbildenden Membranproteine ermöglichen es geladenen Teilchen, sog. Ionen, die Biomembran zu durchqueren und haben Einfluss auf das Membranpotential oder fungieren als Botenstoff (sog. „second messenger“). So kann eine Zelle auf äußere Reize reagieren, diese umwandeln und als Signal ins Innere der Zelle weitergeben. Gerade Ca^{2+} -Ionen sind hier von besonderer Bedeutung. Sie sind nicht nur Ladungsträger, sondern auch wichtiger „second messenger“ bei Signalübertragungen.

Zuerst beschrieben wurden die TRP-Kanäle von Cosens und Manning im Jahre 1969 (Cosens et al. 1969) in einer spontanen Mutante der Drosophila-Fruchtfliege, die sich bei hellem Licht wie blind verhielt. Die beiden brachten dies mit einem Defekt in den Photorezeptoren der Fliege in Verbindung. Erst 20 Jahre später konnten Montell und Rubin (Montell et al. 1989) das TRP Protein identifizieren und benannten es aufgrund der transienten Verarbeitung der Lichtreize in der Drosophila-Mutante *transient receptor potential (TRP)*.

1.3.1 Die Superfamilie der TRP-Kanäle: Struktur und Funktion

Die sogenannte Superfamilie der *Transient Receptor Potential (TRP)*-Kanäle besteht in Säugern aus 28 (im Menschen 27) Mitgliedern, die in insgesamt sechs Unterfamilien eingeteilt werden können: **TRPC** (C für classical bzw. canonical), **TRPV** (V für Vanilloid), **TRPM** (M für Melastatin), **TRPA1** (A für Ankyrin), **TRPP** (P für Polycystin) und **TRPML** (ML für Mucolipin) (dargestellt in **Abbildung 9**) (Montell et al. 2002).

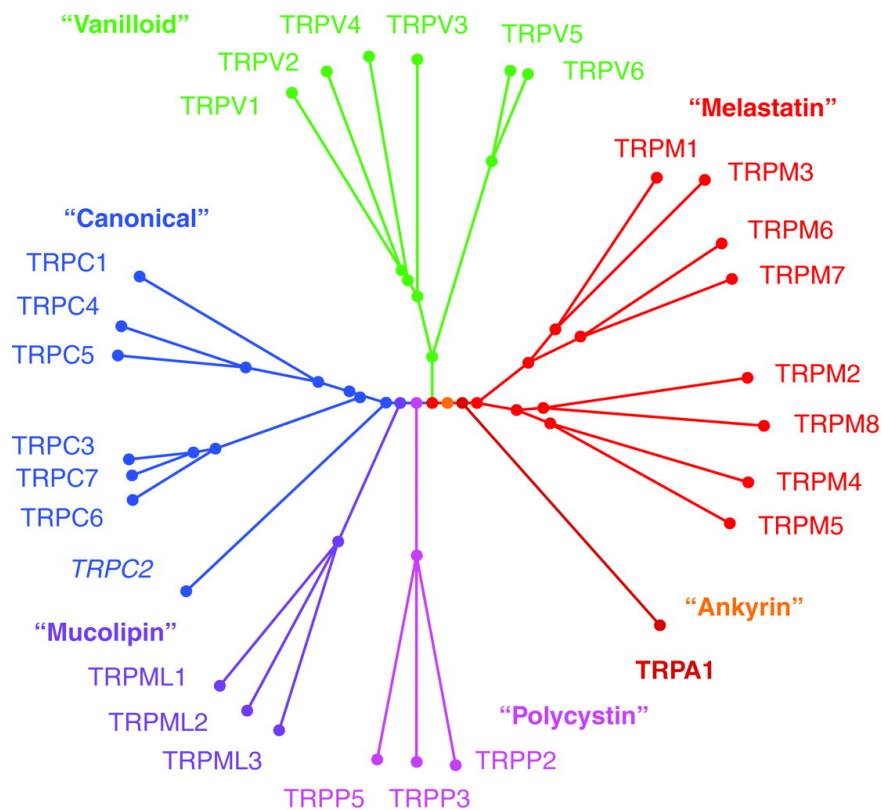


Abbildung 9: Phylogenetischer Stammbaum der Säugetier-TRP-Kanäle. Nach der Homologie in ihrer Aminosäuresequenz werden die 28 Mitglieder der TRP-Kanäle in 6 Familien eingeteilt. TRPC2 ist im Menschen ein Pseudogen. TRPC („classical“ bzw. „canonical“), TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin), TRPA1 (Ankyrin), TRPP (Polycystin) und TRPML (Mucolipin). (Abbildung aus Gees et al. 2010)

Die TRP-Kanäle sind eine große Proteinfamilie, die in verschiedenen Geweben und Zelltypen exprimiert werden. Die TRPC-Kanäle sind den TRP-Kanälen aus der Drosophila-Fliege am ähnlichsten. Zu ihnen gehört das TRPC6-Protein, das Gegenstand dieser Arbeit ist und auf das im Kapitel 1.3.2 näher eingegangen wird. Durch die Klonierung und Identifizierung des Hitzesensors und Capsaicin-Rezeptors **TRPV1** wurde die TRPV-Familie entdeckt. TRPV1 detektiert schmerzhafte Hitzereize (Temperaturen > 43°C), ist verantwortlich für die thermische Überempfindlichkeit bei Entzündungen und ist zuständig für die scharfe Geschmacksempfindung z.B. beim Verzehr einer Chillischote mit dem schärfegebenden Inhaltsstoff Capsaicin (Caterina et al. 1997). Aber auch Kältereize werden durch Vertreter der TRP-Kanäle der Melastatin Familie (TRPM) detektiert. **TRPM8** zum Beispiel, wird nicht nur durch Temperaturen unter 18°C sondern auch durch sog. „cooling compounds“ wie Menthol aktiviert (McKemy et al. 2002). Ein weiter entfernt verwandtes Mitglied der

TRP-Kanalfamilie ist **TRPA1**, ein nozizeptiver Sensor für Kälte und Irritationen, und die **TRPP**- und **TRPML**-Kanäle.

Der Aufbau aller TRP-Kanäle ist in **Abbildung 10** schematisch dargestellt. Alle Kanäle bestehen aus sechs Transmembrandomänen mit der Porenregion zwischen der 5. und 6. Domäne und sind in der Zellmembran verankert (siehe **Abbildung 10a**). Ein funktioneller TRP-Kanal besteht aus vier gleichen (Homotetramere) oder ähnlichen (Heterotetramere) TRP-Untereinheiten, die bevorzugt aus derselben TRP-Familie stammen. Die Porenregionen der einzelnen Untereinheiten lagern sich aneinander und bilden so eine für Kationen (z.B. Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+}) durchlässige Pore (siehe **Abbildung 10b**). (zusammengefasst in Gaudet 2008, Gees et al. 2010)

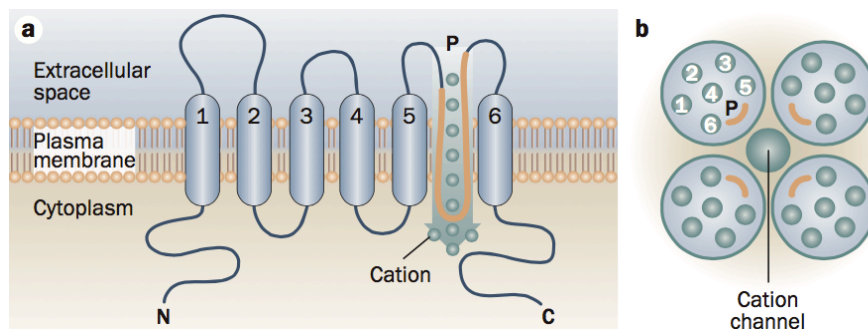


Abbildung 10: Struktur von TRP-Kanälen. a) TRP-Kanäle bestehen aus sechs Transmembrandomänen (1-6). Ein Loop zwischen der 5. und 6. Domäne bildet die porenbildende Region. Der Amino (N)- und der Carboxy (C)-Terminus befinden sich im Zytoplasma. b) Der funktionelle Kationenkanal wird durch vier TRP-Monomere (sog. Tetramere) gebildet. (Abbildung aus Woudenberg-Vrenken et al. 2009)

Hauptunterschiede zwischen den TRP-Familien liegen in der Länge der intrazellulären Amino (N)- und Carboxy (C)- Termini und der Anzahl bestimmter Strukturdomänen (dargestellt in **Abbildung 11**). Hier finden sich Bindungsstellen für Proteininteraktionen, regulatorische oder enzymatische Domänen (z.B. „Ankyrin-repeats“, „Coiled-Coil“-Strukturen, TRP-Boxen, Calmodulin-bindende Domänen, etc.). Sie sind in den unterschiedlichen TRP-Familien für verschiedene Funktionen zuständig (zusammengefasst in Clapham 2003, Owsianik et al. 2006). Beispielsweise sind die in den Unterfamilien TRPC, TRPV, TRPA und TRPN vorkommenden **Ankyrin-Repeats** (kleine Proteinsequenzen, die sich am N-Terminus befinden) vermutlich zuständig für Interaktionen mit Liganden (Gaudet 2008).

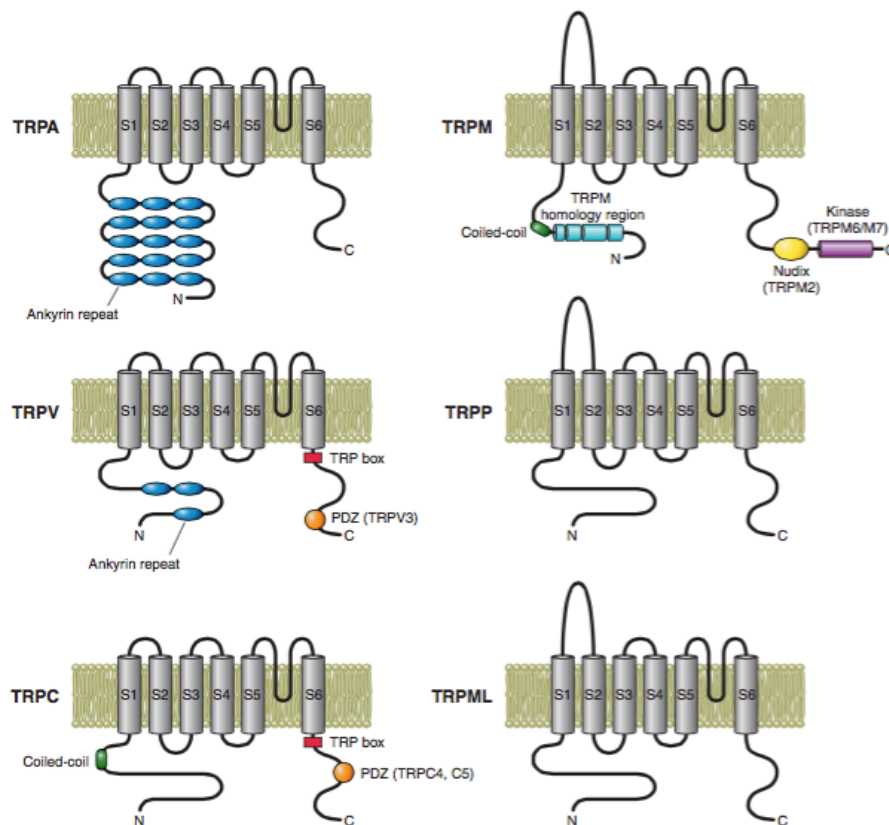


Abbildung 11: Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Topologie der TRP-Unterfamilien. Die TRP-Box befindet sich in den TRPC- und TRPV-Familien im Carboxyterminus direkt hinter der Transmembrandomäne S6. Ankyrin-Domänen („Ankyrin-repeats“) im Aminotermius besitzen Mitglieder der TRPV-, TRPC- und TRPA-Familien, wobei die hohe Anzahl im TRPA1-Protein für dessen Namensgebung verantwortlich war. Im Carboxyterminus der TRPC-Kanäle ist eine Calmodulin/IP₃-bindende (CIRB)-Domäne lokalisiert und TRPC4, TRPC5 und TRPV3 zeichnen sich durch eine PDZ („postsynaptic density protein“-)Domäne aus. TRPM-Kanäle besitzen eine TRPM-Homologie-Domäne im Aminotermius während im Carboxyterminus die sog. NUDIX-Region für TRPM2 oder eine Kinase-Domäne für TRPM6 und TRPM7 charakteristisch sind. Mitglieder der TRPP- und TRPML-Familie hingegen zeigen einen extra langen extrazellulären Loop zwischen der Transmembrandomäne S1 und S2. N: Aminotermius; C: Carboxyterminus; NUDIX: ADP-Ribose-bindende Phosphohydrolase. (Earley et al. 2015)

Da sie in fast jeder Zelle des Körpers exprimiert werden, erfüllen TRP-Kanäle wichtige Funktionen bei einer Vielzahl biologischer Prozesse, wie der sensorischen Signalübertragung (Schmecken, Tasten, Riechen, Hören, Sehen; Temperatur- oder Osmolaritätsveränderungen) aber auch bei der intrazellulären Ca²⁺-Homeostase. TRP-Kanäle fungieren auch als Nozizeptoren und werden durch Chemikalien und mechanische Stimuli aktiviert. (zusammengefasst in Clapham 2003 und Venkatachalam et al. 2007)

Ihre globale Expression erklärt die Mitwirkung an einer Vielzahl von pathologischen Prozessen (zusammengefasst in Nilius et al. 2010, Nilius et al. 2014 und Minke et al. 2002). So sind TRP-Kanäle an der Schmerzentstehung beteiligt (z.B. TRPV1 und TRPV3 bei Migräneanfällen; Carreño et al. 2012) und TRPC-Kanäle vermitteln durch Konstriktion glatter Muskelzellen den Lungenhochdruck (Weissmann et al. 2006, Malczyk et al. 2013; zusammengefasst in Malczyk et al. 2016).

1.3.2 TRPC-Kanäle

Die TRPC-Kanäle sind den TRP-Kanälen aus der Drosophila Fruchtfliege sehr ähnlich, weshalb sie den Namen „klassisch“ bzw. „canonical“ (hierfür steht das „C“ im Namen) bekommen haben.

Die TRPC-Familie besteht aus 7 Mitgliedern (TRPC1-7), welche wiederum entsprechend ihrer Aminosäureidentität und Funktionen in vier Untergruppen eingeteilt werden (Zhu et al. 1996; zusammengefasst in Venkatachalam et al. 2007 und Gees et al. 2010). **TRPC1** war der erste menschliche TRP-Kanal der kloniert wurde (Zhu et al. 1995, Wes et al. 1995, Zitt et al. 1996), da er in fast allen menschlichen und murinen Geweben exprimiert. Seine genaue Funktion ist aber noch unklar (zusammengefasst in Dietrich et al. 2014). **TRPC2** ist ein Pseudogen im Menschen und in der Maus für die Pheromonwahrnehmung essentiell (Wes et al. 1995). **TRPC4** und **TRPC5** sind dem TRPC1 sehr ähnlich und besitzen (neben dem TRPV3) eine PDZ („postsynaptic density protein“)-Domäne im Carboxy-Terminus (siehe **Abbildung 11**). Die vierte Unterfamilie umfasst **TRPC3**, **TRPC6** und **TRPC7**, die auf Aminosäureebene 69% identisch sind und deren Kanalaktivität von ihrer DAG (Diacylglycerol)-Sensitivität geprägt ist (Hofmann et al. 1999; zusammengefasst in Venkatachalam et al. 2002 und Clapham et al. 2001). Grundsätzlich sind alle TRPC-Kanäle Ca^{2+} -permeable Kationenkanäle, deren Selektivität sich für Ca^{2+} und Na^{+} unterscheidet (zusammengefasst in Gees et al. 2010).

1.3.3 TRPC6-Kanäle

1.3.3.1 Proteinstruktur des TRPC6

Die TRPC6-Kanäle gehören zur Familie der TRPC-Kanäle. 1997 wurde zum ersten Mal durch Bouley et al. TRPC6-mRNA aus dem Mausgehirn isoliert und das Gen auf dem Chromosom 9 lokalisiert (Boulay et al. 1997). Die humane cDNA des TRPC6 wurde dann 1999 von Hofmann et al. aus der Plazenta kloniert (Lokalisation des humanen Gens auf dem Chromosom 11q21-q22) (Hofmann et al. 1999). Das murine und das humane Gen besitzen jeweils 13 Exons und die Proteine bestehen aus 930 bzw. 931 Aminosäuren.

Die Struktur des TRPC6-Kanals in der Plasmamembran ist in **Abbildung 12** dargestellt. Wie alle anderen TRP-Kanäle besteht er aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6), intrazellulären Amino (NH₂/N)- und Carboxy (COOH/C)-Termini und der Porenregion zwischen der 5. und 6. Transmembrandomäne. Eine Besonderheit sind die beiden extrazellulären Glykosylierungsstellen, welche für die geringe Basalaktivität des TRPC6-Kanals verantwortlich sind (Dietrich et al. 2003). Ebenfalls charakteristisch sind die vier Ankyrin-Domänen im N-Terminus, die „coiled-coil“-Domänen, die Ca²⁺/Calmodulin-, IP₃-Rezeptor-, Phosphoinositid- (CIRPIB)-Bindestelle im C-Terminus und eine hochkonservierte Struktur im C-Terminus mit einer EWKFAR Aminosäuresequenz (sog. TRP-Box), deren Funktion noch nicht geklärt ist. (zusammengefasst in Dietrich et al. 2014)

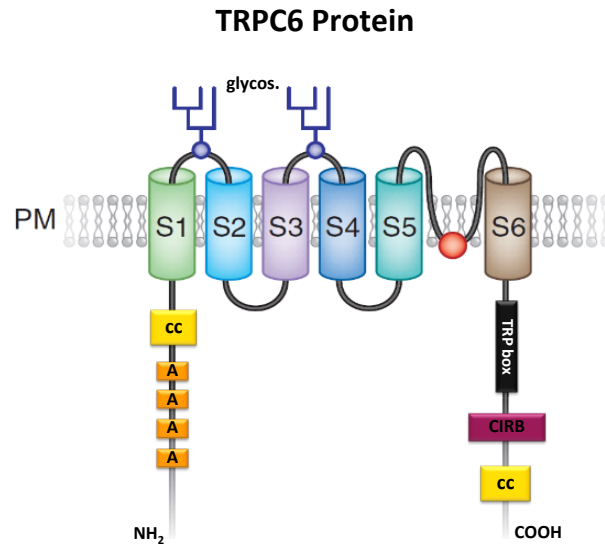


Abbildung 12: Schematischer Aufbau des TRPC6-Kanals. Beschreibung siehe Text. **A:** Ankyrin Domäne; **cc:** Coiled-coil-Struktur; **CIRPIB:** Ca^{2+} /Calmodulin, IP_3 -Rezeptor- und Phosphoinositid-Bindestelle; **glycos.:** Glykosylierungsstelle; **S1-6:** Transmembrandomäne 1-6; **roter Punkt:** Pore; **PM:** Plasmamembran (Abbildung modifiziert nach Dietrich et al. 2010)

Innerhalb der TRPC-Familie bildet der TRPC6 funktionelle Homo- oder Heterotetramere. Mögliche Kombinationen sind in **Abbildung 13** dargestellt (Hofmann et al. 2002, Goel et al. 2002, Strübing et al. 2003, Storch et al. 2012).

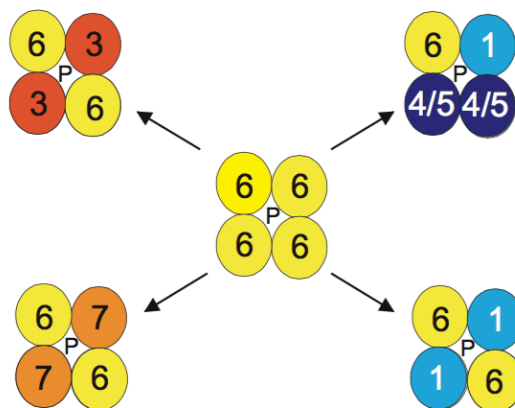


Abbildung 13: Homo- und Heteromultimerisierungspotential des TRPC6-Kanals. TRPC6 kann mit TRPC3, TRPC7 und TRPC1 ein funktionelles Kanaltetramer bilden. Mit TRPC4 und TRPC5 jedoch nur wenn der Komplex eine TRPC1-Untereinheit beinhaltet. (Abbildung aus Dietrich et al. 2014)

1.3.3.2 TRPC6-Signalkaskaden

TRPC6 wird neben TRPC3 und TRPC7 als DAG-sensitiver TRPC-Kanal bezeichnet. So kann TRPC6 über den „second messenger“ Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden (Hofmann et al. 1999; zusammengefasst in Berridge et al. 2000). DAG entsteht durch die Aktivierung einer bekannten Signalkaskade über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR). Durch die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C (PLC) entstehen so Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und DAG. DAG ist lipophil, sammelt sich in der Plasmamembran an und aktiviert den TRPC6-Kanal. Da an diesem TRPC6-vermittelten Ca²⁺-Einstrom keinerlei interne Ca²⁺-Speicher beteiligt sind, spricht man von einem **Rezeptor-Operierten-Ca²⁺-Einstrom (ROCE)** (dargestellt in **Abbildung 14**, blaue Box).

Neben dem ROCE existiert noch der **Speicher-Operierte-Ca²⁺-Einstrom (SOCE)** (dargestellt in **Abbildung 14**, grüne Box). SOCE tritt auf wenn Ca²⁺ durch IP₃ oder ein anderes Signal aus dem intrazellulären Ca²⁺-Speicher, dem sogenannten **Endoplasmatischen Retikulum (ER)**, freigesetzt wird. Der daraus resultierende Abfall der Ca²⁺-Konzentration im ER wird von STIM, einem Protein in der ER-Membran mit einer sogenannte EF-Hand im Inneren des ER, erkannt. Die STIM-Proteine können dann multimierisieren und Orai-Kanäle öffnen, durch die Ca²⁺ in die Zelle einströmt und die internen Speicher wieder auffüllt (zusammengefasst in Cahalan 2009). Die Arbeitsgruppe von Prof. Shmuel Muallem konnte nun zusätzlich noch eine Interaktion der STIM-Proteine mit den TRPC-Kanälen (Yuan et al. 2009; zusammengefasst in Choi 2014) nachweisen, während die Arbeitsgruppe um Prof. Lutz Birnbaumer eine Interaktion von TRPC-Kanälen mit Orai identifiziert hat (Liao et al. 2008; zusammengefasst in Choi et al. 2014). Somit könnte SOCE auch durch komplexe Systeme aus allen drei Proteinen, STIM, Orai und TRPC6, induziert werden (Yuan et al. 2009, Liao et al. 2008; zusammengefasst in Dietrich et al. 2014).

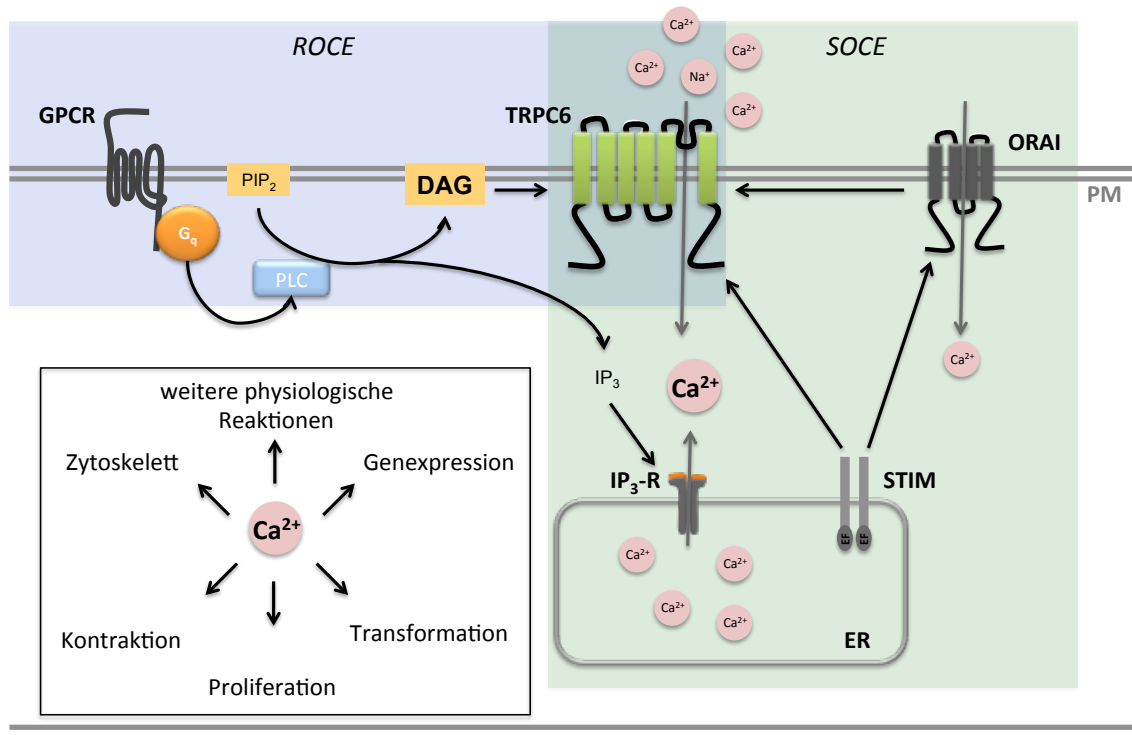


Abbildung 14: Signaltransduktionskaskaden für den TRPC6-induzierten Ca^{2+} -Einstrom und mögliche physiologische Reaktionen auf die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Beschreibung siehe Text. ROCE: Rezeptor-operierter- Ca^{2+} -Einstrom; G_q : Phospholipase C-gekoppeltes G-Protein; GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor; PLC: Phospholipase C; PIP_2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; DAG: Diacylglycerol; SOCE: speicher-operierter- Ca^{2+} -Einstrom; IP_3 : Inositol-1,4,5-trisphosphat; IP_3 -R: IP_3 -Rezeptor; ER: endoplasmatisches Retikulum; STIM: „stromal interaction molecule“.

Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration aktiviert verschiedene Ca^{2+} -abhängige Signalkaskaden, die z.B. Zellproliferation, Kontraktion oder Genexpression induzieren können (siehe weiße Box in **Abbildung 14**; zusammengefasst in Berridge et al. 2000).

1.3.3.3 Gewebsspezifische Expression und Funktion des TRPC6-Kanals

TRPC6-Proteine werden in vielen Geweben exprimiert; jedoch vor allem in Gehirn und Lunge (Boulay et al. 1997) und in Geweben mit glatter Muskulatur (Hofmann et al. 2000). Im Glomerulus der Niere konnten sog. „gain-of-function“ (überaktivierte)-Mutationen im TRPC6-Kanal nachgewiesen werden, die zur Entwicklung einer Erkrankung mit dem Namen Fokale Segmentale Glomerulosklerose (FSGS) beitragen (Winn et al. 2005; zusammengefasst in Dietrich et al. 2014). Patienten mit FSGS zeigen eine progressive Vernarbung des Glomerulargewebes, was zu einer Funktionsschwäche der Niere mit Proteinverlust über den Urin (Proteinurie),

Ödemen und Bluthochdruck führt und letztlich mit einem Nierenversagen enden kann.

In der Lunge wird TRPC6 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert, spielt also eine wichtige Rolle im pulmonalen Gefäßsystem. Nach einer Lungentransplantation zählt der Ischämie-Reperfusionsschaden zu den lebensbedrohlichen Situationen, während der es durch eine Dysfunktion im Endothel zur Entstehung eines Lungenödems kommen kann (sog. „lung-ischaemia-reperfusion-induced edema“/LIRE; De Perrot et al. 2003). Durch seine Expression im Endothel hat der TRPC6-Kanal eine wichtige Funktion für die Barrierefunktion der Lungenarterien. So konnte unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Gießener Wissenschaftlern zeigen, dass TRPC6-defiziente Mäuse vor LIRE nach einer Lungentransplantation geschützt sind (Weissmann et al. 2012).

Die glatte Muskulatur in der Lunge reguliert den Gefäßtonus und den Blutdruck. Auch hier wird der TRPC6-Kanal exprimiert und ist an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt (Dietrich et al. 2005). Im Gegensatz zum systemischen Blutkreislauf, wo eine Sauerstoffarmut (Hypoxie) zu einer Vasodilatation führt, kommt es in der Lunge zu einer lokalen Vasokonstriktion der kleinen Lungenarterien im hypoxischen Gewebe. So wird der Blutfluss vom hypoxischen in den normoxischen Bereich umgeleitet, um weiterhin eine Sauerstoffversorgung durch die gut ventilierten Gefäße zu gewährleisten (sog. HPV/Hypoxische Pulmonale Vasokonstriktion oder Euler-Lijestrand-Effekt; Euler et al. 1946). In isolierten perfundierten Lungen aus TRPC6-defizienten Mäusen konnte akute Hypoxie keine HPV (sog. aHPV) mehr auslösen, so dass die TRPC6-defizienten Mäuse nach einer teilweisen Blockade der Lunge aufgrund des Euler-Lijestrand-Effektes an einer arteriellen Hypoxämie litten (Weissmann et al. 2006).

Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Molkentin eine Beteiligung des TRPC6-Ionenkanals an der kardialen und dermalen Wundheilung belegen (Davis et al. 2012). TRPC6-defiziente Mäuse zeigten nach einer Verletzung eine beeinträchtigte Wundheilung und der Kanal ist in der Haut und im Herzen an der TGF- β_1 -induzierten Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt.

1.3.3.4 Pharmakologie des TRPC6

Die Erforschung von Pharmaka, die die Wirkung und Aktivität des TRPC6-Kanals beeinflussen hat in den letzten Jahren eine Vielzahl an neuen sog. TRPC6-spezifischen Aktivatoren und Blockern hervorgebracht.

Schon lange bekannt ist die unspezifische Inhibition des TRPC3- und TRPC6-induzierten Ca^{2+} -Einstroms durch die Ionen der seltenen Erdmetalle **Gadolinium** (Gd^{3+} ; IC_{50} 1,9 μM) und **Lanthan** (La^{3+} ; IC_{50} 4-6 μM) (Inoue et al. 2001). TRPC4 und TRPC5 hingegen werden durch diese dreiwertigen Ionen konzentrationsabhängig stimuliert (Jung et al. 2003). Eine weitere Anzahl an Substanzen die den Ca^{2+} -Einstrom durch TRPC6 inhibieren wie **2-ABP** (2-Aminoethoxydiphenylborat), das Imidazolderivat **SKF96365** (1- $[\beta$ -(3-(4-methoxyphenyl)propoxy)4-methoxyphenethyl]-1H-imidazol Hydrochlorid), Antimykotika wie z.B. **Clotrimazol** und **Econazol**, **W7** (N-(6-Aminoethyl)5-chloro-1-naphthalensulfonamid Hydrochlorid) und **Substanz 8009-5364** (Harteneck et al. 2011, Urban et al. 2012; zusammengefasst in Bon et al. 2013) wurden beschrieben. Jedoch eigneten sie sich alle nicht für den therapeutischen Einsatz, da es ihnen an Selektivität und oraler Bioverfügbarkeit fehlte.

In den letzten Jahren wurden allerdings neue und spezifischere TRPC6-Blocker (Maier et al. 2015, Urban et al. 2012, Urban et al. 2016) entdeckt. In Analogie zum Blocker SKF96365 entdeckte die Gruppe um Dr. Strübing eine neue Klasse an Inhibitoren, die SAR7334. Diese Verbindungen zeigten im Tiermodell eine effektive Inhibition der aHPV (akute hypoxische pulmonale Vasokonstriktion in der Maus) im nanomolaren Bereich ($\text{IC}_{50} \approx 100\text{nM}$), eine gute Bioverfügbarkeit und eine hohe Selektivität (gegenüber TRPC3 und TRPC7) (Maier et al. 2015). 2016 identifizierte die Gruppe um Prof. Schaefer das **Larixol** als potenten TRPC6-Inhibitor (Urban et al. 2016). Larixol ist ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff aus dem Harz der Lärche und konnte die aHPV in isolierten Mauslungen mit einer IC_{50} von 0,1 - 0,6 μM inhibieren, sowie durch seine Selektivität überzeugen. Das therapeutische Potential beider Substanzen muss noch genauer untersucht werden.

Neben der Vielzahl an TRPC6-inhibierenden Substanzen gibt es auch Stimulatoren. Der wohl bekannteste TRPC6-Aktivator ist das **OAG** (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol), ein membranpermeables DAG-Analogon. Es konnte gezeigt werden, dass OAG in normalen isolierten nicht aber in TRPC6-defizienten Mauslungen eine aHPV induzieren konnte (Fuchs et al. 2011). In einem heterologen Expressionssystem in

HEK293-Zellen stellte sich heraus, dass der unspezifische Kationen-Kanalblocker **Flufenamat** (FFA) aktivierend auf TRPC6, jedoch inhibierend auf die nahverwandten TRPC3- und TRPC7-Kanäle, wirkt (Foster et al. 2009). FFA induzierte auch in primären Lungenendothelzellen einen nativen TRPC6-Strom (Weissmann et al. 2012), der in TRPC6-defizienten Zellen fehlt. Es wurde auch berichtet, dass **Hyperforin** aus dem Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), das bereits als antidepressiv-wirkende Droge eingesetzt wird, den TRPC6-Kanal mit einer IC₅₀ von 1 µM aktiviert aber keinen Effekt auf den TRPC3-Kanal zeigt (Leuner et al. 2007). Allerdings konnte in unserer Arbeitsgruppe kein spezifischer Effekt von Hyperforin im heterologen Expressionssystem auf den TRPC6-Kanal nachgewiesen werden (Dissertation Tim Mayer, 2016). Die in den Versuchen beobachtete TRPC6-unabhängige Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration kann beispielsweise mit der Ca²⁺-Freisetzung aus internen Speichern erklärt werden (Tu et al. 2010). Darüber hinaus wurde noch ein Hyperforin-induzierter TRPC6-unabhängiger H⁺-Strom beschrieben (Sell et al. 2014).

Trotz der kontroversen Datenlage, könnten einige dieser Substanzen zukünftig die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten für Patienten mit Lungenerkrankungen oder FSGS unterstützen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie oben beschrieben wird die Ursache für die Ausbildung einer Lungenfibrose in einer gestörten Wundheilung vermutet. Da bereits gezeigt werden konnte, dass der TRPC6-Ionenkanal während der Wundheilung in Haut- und Herzfibroblasten eine wichtige Rolle spielt und nach TGF- β_1 -Induktion in Myofibroblasten vermehrt exprimiert wird (Davis et al. 2012), sollte in dieser Arbeit die Funktion des TRPC6-Kanals während der Ausbildung einer Lungenfibrose untersucht werden.

Die Ziele dieser Arbeit wurden wie folgt definiert (bildlich dargestellt in

Abbildung 15):

- Vergleichende Untersuchungen an WT- und TRPC6-defizienten Mäusen während der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose.
- Etablierung einer Methode zur Isolierung von primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) aus der Maus in Anlehnung an eine bereits veröffentlichte Methode (Staab-Weijnitz et al. 2015) und Identifizierung der kultivierten pmLFs.
- Untersuchungen der Myofibroblasten-Transformation durch TGF- β_1 auf zellulärer Ebene.

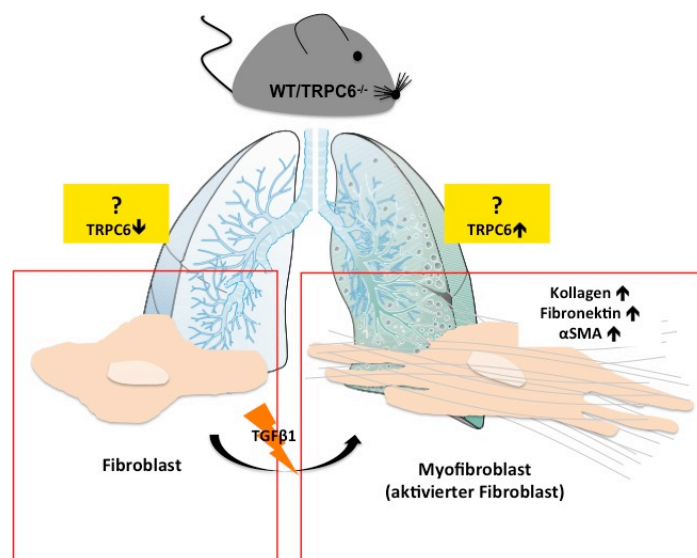


Abbildung 15: Bildliche Darstellung der Ziele dieser Arbeit. Wildtyp (WT) und TRPC6-defiziente (TRPC6^{-/-}) Mäuse sollten hinsichtlich der Ausbildung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose verglichen werden. Primäre murine Lungenfibroblasten wurden aus WT- oder TRPC6-defizienten Mäusen isoliert und identifiziert und die Myofibroblastentransformation nach TGF- β_1 -Stimulation verglichen. ↑: hoch; ↓: niedrig (Lunge im Hintergrund aus Fernandez et al. 2012).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mauslinien

Tabelle 2-1: Mauslinien

Mauslinie	Genetischer Hintergrund
TRPC6 ^{-/-} (Dietrich et al. 2005)	C57BL/6
Wildtyp (aus der gleichen Kolonie)	C57BL/6

2.1.2 Zellen und Zellkulturmedien

Tabelle 2-2: Zellen

primäre Zellen	murine Lungenfibroblasten/pmLF murine Podozyten (Jana Demleitner/AG Dietrich)
Zelllinien	Murine embryonale Fibroblasten/MEF humane embryonale Nierenzellen/HEK293T

Tabelle 2-3: Zellkultur-Lösungen

Produkt	Hersteller
DMEM	Lonza, Basel, Schweiz
DMEM/F12	Lonza, Basel, Schweiz
PBS 1x	Lonza, Basel, Schweiz
HBSS 1x	Lonza, Basel, Schweiz
FCS	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin	Lonza, Basel, Schweiz
Penicillin/Streptomycin	Lonza, Basel, Schweiz

Tabelle 2-4: Zellspezifische Medien

Name	Kulturmedium	Zusätze	Split-Verhältnis
pmLF	DMEM/F12	20% FCS 1% Penicillin/Streptomycin	1:3 – 1:4
HEK 293T	DMEM	10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin	1:10 – 1:20
MEF	DMEM	10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin	1:10 – 1:15

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2-5: Chemikalien

Produkt	Firma	Artikelnummer
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe	7328.2
Acetonitril	Merck Millipore, Darmstadt	100030
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe	2267.4
Atipamezol	Orion Pharma, Hamburg	
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe	K029.1
Amphotericin B	Sigma Aldrich, Deisenhofen	A9528
Angiotensin II	Sigma Aldrich, Deisenhofen	A9525
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	215589
Bleomycin-Sulfat	Sigma Aldrich, Deisenhofen	
BAPTA/1,2-Bis(2-aminophenoxy)- ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Sigma Aldrich, Deisenhofen	A4926
Bouins Lösung	Sigma Aldrich, Deisenhofen	HT10132
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen	B0126
BSA (Kälber Serum Albumin)	Sigma Aldrich, Deisenhofen	9418
CaCl ₂ × 2H ₂ O	Sigma Aldrich, Deisenhofen	C3306
Collagenase Typ I	Merck Millipore, Darmstadt	C 1-28
CsCl	Sigma Aldrich, Deisenhofen	289329
DMSO	Riedel-D-Haënn, Seelze b. Hannover	60153

EDTA	Carl Roth, Karlsruhe	CN06.2
Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat	Merck Millipore, Darmstadt	103943
Entellan®	Merck Millipore, Darmstadt	107961
Entwickler DOKUMOL	TETENAL AG, Norderstedt	
Eosin Y Lösung (0,5%)	Carl Roth, Karlsruhe	X883
Essigsäure	VWR, Darmstadt	UN2789
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe	5054.3
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Deisenhofen	E4391
Fentanyl	Janssen-Cilag	
Flumazenil	Hexal, Holzkirchen	
Formaldehyd	Sigma Aldrich, Deisenhofen	252549
Fura-2AM	Sigma Aldrich, Deisenhofen	47989
Glukose	Merck Millipore, Darmstadt	8337
Glycerin 87%	Merck Millipore, Darmstadt	1.04091
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	0079.4
Goatserum	Bio-West	S2000-100
Hämatoxylin, krist.	Merck Millipore, Darmstadt	10432
HCl	Merck Millipore, Darmstadt	1.003U7
HEPES/4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	Carl Roth, Karlsruhe	9105.3

Höchst 33342 [10 mg/ml]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA/USA	62249
Igepal CA 630	Sigma Aldrich, Deisenhofen	18896
Isopropanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen	6752.3
Kaliumchlorid/KCl	Carl Roth, Karlsruhe	6781.1
Ketamin	Bela pharm, Vechta	
KH_2PO_4	Carl Roth, Karlsruhe	6875.2
KOH	Carl Roth, Karlsruhe	2526.1
Kupfer-II-Sulfat	Sigma Aldrich, Deisenhofen	C8027
Mayer's Hämalun	Carl Roth, Karlsruhe	T865
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe	T145.2
Magnesiumchlorid/ MgCl_2	Carl Roth, Karlsruhe	KK36.2
Magnesiumchlorid Hexahydrat/ $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma Aldrich, Deisenhofen	M2393
Medetomidin	Orion Pharma, Hamburg	
Mercaptoethanol	Merck Millipore, Darmstadt	805740
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe	P717.1
Midazolam	Roche Pharma, Mannheim	
Mountingmedium	Dako, Hamburg	53023
Nagellack, klar	Wild Shine,Basingstoke,GB	E4063
Naloxon	Actavis, München	
Natriumacetat	Merck Millipore, Darmstadt	106268
Natrium Azid	Sigma Aldrich, Deisenhofen	822335
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe	HN01.1

Natriumchlorid/NaCl	Carl Roth, Karlsruhe	9265.1
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich, Deisenhofen	16026
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth, Karlsruhe	T876.1
Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma Aldrich, Deisenhofen	S6672-500G
Natriumtetraborat/Borax	Sigma Aldrich, Deisenhofen	221732
NBD-Cl/4-Chlor-7-Nitrobenzofurazan	Sigma Aldrich, Deisenhofen	25455
OAG/1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol	Merck Millipore, Darmstadt	495414
Ponceau S	Applichem/Panreac, Darmstadt	A2935
PureCol [®] (purified bovine Collagen solution)	Advanced BioMatrix	5005
Rompun	Bela pharm, Vechta	
Rotiphorese Gel	Carl Roth, Karlsruhe	3029.1
Salzsäure conc (37% = 12 M)	Merck Millipore, Darmstadt	100317
SDS/Natriumlaurylsulfat	Sigma Aldrich, Deisenhofen	L4390
Stickstoff (N ₂) flüssig	Linde, München	N2 flüssig
TEMED/Tetramethylethyldiamin	Carl Roth, Karlsruhe	2367.1
TGF-β ₁ , rekombinant, human	R&D Systems; Minneapolis, USA	240-B-002/CF
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe	AE15.2
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe	3051.2
Tween 20	Sigma Aldrich, Deisenhofen	2287
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe	9713.1

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-6: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma
Deckgläser/Glasplättchen	Menzel, Marienfeld
Einmal-Skalpelle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmal-Spritzen 1 ml, 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmal-Sterilfilter 0,22 µm/45 µm	Merck Millipore, Billerica, USA
<i>HPLC Trennsäule</i> : LiChroCart	Merck Millipore, Darmstadt
LiChrospher 60 RP-18 select B, 5 µm, 250x4 mm	
<i>HPLC Vorsäule</i> : LiChroCart guard column gefüllt mit LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 4x4 mm	Merck Millipore, Darmstadt
Röhrchen („Falcon“): 50 ml/15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kryogefäße 1 ml/1,5 ml/2,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturflaschen (T25/T75/T175)	Sarstedt, Nümbrecht
LightCycler® 480 Multiwell Platte 96, weiß	Roche, Basel, Schweiz
Nitrozellulosemembran PROTRAN	Whattmann, Dassel
Objektträger	Menzel, Marienfeld
Folie („Parafilm“)	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	
PCR-Tubes	Greiner BioOne, Frickenhausen
Petrischalen (3,5 cm/10 cm/15 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen 6-/24-/96-Well	Corning, Omnilab Bremen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran Roti fluora	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml/2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 5ml	Eppendorf, Hamburg
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter	Merck Millipore, Billerica, USA
Zellkulturpipetten	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.5 Laborausstattung

Tabelle 2-7: Laborausstattung

Produkt	Hersteller
Abzugssysteme	Waldner, Wangen
Autoklaviersystem	Hp Medizintechnik, Oberschleißheim
Binokular SD30	Olympus, Hamburg
Ca ²⁺ -Imaging System	TILL-Photonics, Gräfelfing
Ca ²⁺ -Imaging Filtersets	AHF Analysetechnik, Tübingen
CO ₂ -Inkubator Heracell150i	Thermo Fisher Scientific., Schwerte
Dokumentationssystem für DNA-Gelelektrophorese	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer DNA	Peqlab, Erlangen
Elektrophoresekammer Proteine	Amersham, Bioscience, GE, Freiburg
Elektroporationsgerät Nucleofactor II	AMAXA, Lonza, basel, Schweiz
Elektroporationsgerät NEON	Invitrogen, CA, USA
Fluoreszenzmikroskop	Olympus, Hamburg
Gewebezerkleinerer Handgerät	Xenox, Föhren
Heizplatte	VWR, Darmstadt
Hitzesterilisator FunctionLine Instruments	Heraeus, Thermo Fisher Sci., Schwerte
HPLC: LaChrom Elite/UV-DAD System	VWR, Darmstadt
<ul style="list-style-type: none"> • Gradientenpumpe Intelligent mit integriertem Degasser Hitachi L-2130 • automatischer Probengeber Hitachi L-2200 • UV-DAD-Detektor Hitachi L-2450 	
Kippschüttler	Peqlab, Erlangen
Kryokonservierungsbox	Nalgene, Sigma-Adrich, Deisenhofen
Lightcycler® 480 II	Roche, Basel, Schweiz
Mikro-Dismembrator S	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
MicroSprayer (Typ MS-IA-1C)	Penn-Century, Wyndmoor, USA
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

Mirax Desk Scanner (Objektträger Scanner)	Zeiss, Jena
Nanophotometer (Nanodrop)	Implen, München
OP-Besteck	FST, Berlin
Odyssey [®] Fc Western Blot Imaging	LI-COR, Lincoln, USA
Osmometer Vapro 5520	Wescor Inc., Logan, USA
PCR Thermocycler	Peqlab, Erlangen
pH Elektrode SenTix 81	WTW, Weilheim
pH-Meter InoLab pH7110	WTW, Weilheim
Photometer	Tecan, Crailsheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg/Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetus [®] Junior	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pumpe Zellkultur BUC21	Vacubrand, Wertheim
Rotationsmikrotom Hyrax M55	Zeiss, Jena
Schüttelinkubator	Thermo Fisher Sci./Fermentas, Waltham, USA
Schweißgerät F380	Krups, Offenbach am Main
Spannungsquelle Peqpower	Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank/Laminarflow	Heraeus, Hanau
Thermomix Proben temperierer	Eppendorff, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 20 Labfuge	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Mikro 22R Labfuge	Hettich, Tuttlingen
Transferkammer Westernblot	Biorad, München
Vortexgeräte Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad Tauchsieder	MGW, Lauda, Lauda-Königshofen
Zellkulturmikroskop Wilover AFL 40 Phako	Hund, Wetzlar
Zentrifuge Rotana/R E1210	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Sorval RC5C Plus	Sorval, Thermo Fisher Sci., Schwerte
Zentrifuge Labfuge 400	Thermo Fisher Sc., Schwerte
-80°C Gefrierschrank U410	Eppendorf, Hamburg

2.1.6 Puffer und Lösungen

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden in deionisiertem Wasser (VE-Wasser) angesetzt, soweit nicht anders beschrieben. Angegebene pH-Werte beziehen sich auf Raumtemperatur (RT) und wurden, soweit nicht anders angegeben, mit NaOH und mit HCl eingestellt. Die Substanzen wurden in Analysequalität von den Firmen aus Tabelle 2-5 bezogen.

Tabelle 2-8: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Konzentration/Menge	Substanz
Acetonitril, 26% (^{vol} / _{vol})	26% v/v	Acetonitril (in Millipore- H ₂ O)
Höchst 33342	10 mg/ml	in 1x PBS
Lämmli-Puffer, 6x	375 mM	4x Tris/ SDS Puffer (pH 6,8)
	48%	Glycerin
	6%	SDS (Natriumlaurylsulfat)
	0,03%	Bromphenolblau
	9%	β-Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese	250 mM	Tris Base
	1,920 M	Glycin
	35 mM/1%	SDS (Natriumlaurylsulfat)
Mobile Phase A (HPLC)	8%	Acetonitril in 50 mM Natriumacetat
Mobile Phase B (HPLC)	75%	Acetonitril in Millipore-H ₂ O
Natriumacetat, 50 mM	50 mM	Natriumacetat in Millipore-H ₂ O
		pH 6,4 eingestellt mit sterilfiltrierter 0,1 M NaOH

Natriumacetat, 167 mM	167 mM	Natriumacetat in 26% Acetonitril
Natriumtetraborat/Borax	0,4 M	Natriumtetraborat in Millipore-H ₂ O
		pH 9,5 eingestellt mit sterilfiltrierter 0,1 M NaOH
NBD-Cl (4-Chlor-7-Nitrobenzofurazan)	12 mM	NBD-Cl in Methanol
Paraformaldehyd Lösung, 3,7%	10% v/v	Paraformaldehyd in 1x PBS
PBS, 1x	10% v/v	10x PBS
PBS, 10x	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	101 mM	Na ₂ HPO ₄
	18 mM	KH ₂ PO ₄
PBST	0,5%	Tween 20 in 1x PBS
Phosphorwolfram-	25%	Phosphorwolframsäure
/Phosphormolybdänsäure	25%	Phosphormolybdänsäure
RIPA-Protein-Lysepuffer	1%	Igepal CA 630
	0,5%	Na-deoxycholat
	0,1%	SDS (Natriumlaurylsulfat) in 1x PBS
		Vor Gebrauch Protease- Inhibitor zugeben: 1 Complete Mini Tablette in 10 ml

Stripping-Puffer	100 mM	NaOH
	2%	SDS
	0,5%	(Natriumlaurylsulfat)
		DTT
Transferpuffer (Western Blot)	250 mM	Tris Base
	1,920 M	Glycin
	7 mM/2%	SDS
		(Natriumlaurylsulfat)
Tris/SDS Puffer, 4x	500 mM	Tris Base
pH 6,8	1 mM	SDS
		(Natriumlaurylsulfat)
		pH 6,8 bei Verwendungstemperatur (4-8 °C) einstellen
Tris/SDS Puffer, 4x	1,5 mM	Tris Base
pH 8,8	14 mM	SDS
		(Natriumlaurylsulfat)
		pH 8,8 bei Verwendungstemperatur (4-8 °C) einstellen
Weigert's Eisenlack	50%	Weigert's Lösung A
	50%	Weigert's Lösung B
Weigert's Stammlösung A	10 g/l	Hämatoxylin in 96% Ethanol
Weigert's Stammlösung B	11,6 g/l	Eisen (III)-Chlorid- Hexahydrat
	1,5 M	HCl

2.1.7 Kits und Marker

Tabelle 2-9: Kits

Produkt	Firma	Artikelnummer
Absolute qPCR SYBR® Green Mix, enthält:	Thermo Fi. Sci., Schwerte	AB/ 1158
<ul style="list-style-type: none"> • SYBR® Green I (Farbstoff) • Thermo-Start DNA-Polymerase • Reaktionspuffer • dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) 		
BCA Assay	Pierce, Thermo Fi. Sci., Schwerte	23225
Cell Contraction Assay	Cell Biolabs, Inc.	CBA-201
<i>Chemilumineszenzsubstrate (Western Blot HRP-Substrate):</i>		
<ul style="list-style-type: none"> • Luminata Forte • SuperSignal West Dura 	Merck Millipore, Schwalbach Thermo Fi. Sci., Schwerte	WBLUF0100 34075
Erststrangsynthese Kit	Fermentas, Waltham, USA	K1831
Hydroxyproline Assay	Sigma Aldrich, Deisenhofen	MAK008
Invitrap® Spin Universal RNA Mini Kit	Stratec Molecular, Berlin	1060100300
Nuclear Extract Kit	Active Motif, Carlsbad, USA	40010
Sircol Collagen Assay	Biocolor, Le-Perray-en-Yveline, Frankreich	S1000
Trichrome Stain (Masson) Kit, enthält:	Sigma Aldrich, Deisenhofen	HT15
<ul style="list-style-type: none"> • Anilinblau • Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin • Phosphorwolframsäure • Phosphormolybdänsäure 		

Tabelle 2-10: Marker

Produkt	Firma	Artikelnummer
DNA GeneRuler 100bp	Fermentas, Waltham, USA	SM0241
DNA GeneRuler 1kb	Fermentas, Waltham, USA	SM0312
SDS-gel-Marker	Fermentas, Waltham, USA	26616, 26625, 26634
6x DNA Loading Dye	Fermentas, Waltham, USA	R0611

2.1.8 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 2-11: Auflistung aller verwendeten murinen Primer

Gen	Richtung	Sequenz 5' - 3'	Produkt [Bp]
TRPC-Primer			
TRPC1 T	sense	TGA ACT TAG TGC TGA CTT AAA GGA AC	75
	antisense	CGG GCT AGC TCT TCA TAA TCA	
TRPC2 T	sense	CAC GAA AGG AGC CTG AGT TTA	78
	antisense	CCA GCA ACT CGA AGC CAT AG	
TRPC3 T	sense	TTA ATT ATG GTC TGG GTT CTT GG	91
	antisense	TCC ACA ACT GCA CGA TGT ACT	
TRPC4 T	sense	AAG GAA GCC AGA AAG CTT CG	92
	antisense	CCA GGT TCC TCA TCA CCT CT	
TRPC5 H	sense	ATG AGG GGC TAA CAG AAG A	210
	antisense	TGC AGC CTA CAT TGA AAG	
TRPC6 _{ex7}	sense	GCAGCTGTTTCAGGATGAAAAC	85
	antisense	TTCAGCCCATATCATGCCTA	
TRPC7 H	sense	CCT ACG CCA GGG ATA AGT G	205
	antisense	AAG GCC ACA AAT ACC ATG A	

m β Actin	sense	CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG	104
	antisense	ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA	

Fibrosemarker

α SMA/Acta2	sense	GCT GGT GAT GAT GCT CCC A	81
	antisense	GCC CAT TCC AAC CAT TAC TCC	
Collagen1 α 1	sense	CCA AGA AGA CAT CCC TGA AGT CA	129
	antisense	TGC ACG TCA TCG CAC ACA	
Fibronectin1	sense	GGT GTA GCA CAA CTT CCA ATT ACG	92
	antisense	GGA ATT TCC GCC TCG AGT CT	
Serpin1/PAI1	sense	AGG TCA GGA TCG AGG TAA ACG AG	104
	antisense	GGA TCG GTC TAT AAC CAT CTC CGT	

2.1.9 Erstantikörper

Tabelle 2-12: Tabellarische Auflistung aller verwendeten Erstantikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung		Hersteller	Nummer
		Western Blot	Immunfluoreszenz		
α SMA	Maus	1:2.000	1:2.000	Sigma Aldrich, Deisenhofen	A5228
Fibronektin	Kanninchen		1:200	Santa Cruz, Dallas, USA	sc-9068
Collagen1 α 1	Kanninchen		1:50	Rockland, Gilbertsville, USA	600- 401-103
Lamin B1	Kanninchen	1:5.000		Thermo Fisher Sc., Schwerte	PA5- 19468
TRPC6	Kanninchen	1:200		Flockerzi Labor, Homburg	
Vinculin	Maus	1:10.000		Sigma Aldrich, Deisenhofen	V9131
β -Aktin- POX	Maus	1:10.000		Sigma Aldrich, Deisenhofen	A3854
TRITC- Phalloidin	<i>Amanita phalloides</i> (Knollenblät erpilz)		50 μ g/ml	Sigma Aldrich, Deisenhofen	P1951

2.1.10 Zweitantikörper

Tabelle 2-13: Tabellarische Auflistung aller verwendeten Zweitantikörper

Antigen	Wirt	Verdünnung		Hersteller	Nummer
		Western Blot	Immunfluoreszenz		
anti-mouse IgG, HRP linked	Pferd	1:2.000		Cell Signaling, Danvers, USA	7076S
anti-rabbit IgG, HRP linked	Ziege	1:10.000		Sigma Aldrich, Deisenhofen	A6154
Anti-mouse- FITC	Ziege		1:80	Sigma Aldrich, Deisenhofen	F9006
Anti-rabbit- Alexa488	Ziege		1:500	Life Technologies, Carlsbad, USA	A11008

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologie

2.2.1.1 RNA-Isolation

In dieser Arbeit wurde die Gesamt-RNA aus pulverisierter Lunge oder aus verschiedenen Zellen (z.B. Lungenfibroblasten) mit Hilfe eines RNA-Isolations Kits (InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit) von der Firma Stratec isoliert. Hierbei wurde nach Angaben des Herstellerprotokolls vorgegangen: das Gewebe oder die Zellen wurden mit einem speziellen Lysepuffer lysiert, über Affinitätssäulen wurde zunächst die genomische DNA entfernt und anschließend, nach mehreren Waschschritten, die reine Gesamt-RNA eluiert. Diese wurde entweder für die Erststrangsynthese weiterverwendet oder umgehend bei -80°C eingefroren.

2.2.1.2 Erststrangsynthese (cDNA-Synthese)

Die aus Zellen oder Gewebe isolierte mRNA wurde mittels dem Enzym „Reverse Transkriptase“ in copy DNA (cDNA: einzelsträngige komplementär-DNA) umgeschrieben. Dies wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des „cDNA-Synthese-Kit“ der Firma Thermo Fisher/Fermentas durchgeführt. Es wurde laut Herstellerangaben vorgegangen und die nötigen Inkubationsschritte wurden mit einem Thermocycler der Firma Peqlab durchgeführt. Die erhaltene cDNA wurde entweder für die quantitative RT-PCR weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.2.1.3 Quantitative RT(Reverse Transkriptase)-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Bei der qRT-PCR (quantitative Reverse Transkriptase-PCR) kann indirekt über die cDNA der mRNA-Gehalt für ein spezifisches Gen in einem Proteinlysate quantifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgt über einen Fluoreszenzfarbstoff welcher sich in doppelsträngige DNA einlagert. Die Fluoreszenz nimmt proportional zum PCR-Produkt zu und kann in Echtzeit über eine Fluoreszenzmessung nach jedem PCR-Zyklus (d.h. nach jedem „Elongations“-Schritt) quantifiziert werden. Die mRNA Konzentration eines sog. „gene of interest“ wird mit der Expression eines „housekeeping“ Gens, das unter den jeweiligen Bedingungen unverändert exprimiert wird, verglichen (relative Quantifizierung).

In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff „SYBR®-Green I“ (enthalten im SYBR® Green Mix) von der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet und zwei „housekeeping“ Gene analysiert: β -Aktin und HPRT. Die Reaktion erfolgte in einem Roche Lightcycler® 480 II und die Fluoreszenz wurde nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 494 nm bei 521 nm gemessen.

Zunächst wurden 2 μ l der jeweiligen Oligonukleotidmischung („sense“ und „antisense Primer“ 1:10, entspricht einer Endkonzentration von 10 pmol, verdünnt in bidestilliertem Wasser) je Probe in einer 96-Lochplatte (Roche) vorgelegt. Anschließend wurde der entsprechende „Mastermix“ (Tabelle 2-14) hinzupipettiert und die Platte mit der mitgelieferten Klebefolie verschlossen. Die Flüssigkeit wurde bei 800 Umdrehungen pro Minute für 2 min in die Kavität zentrifugiert, die Platte in den Lightcycler® 480 II gestellt und das Programm gestartet. Als Negativkontrolle wurde der „Mastermix“ mit bidestilliertem Wasser statt der cDNA angesetzt.

Tabelle 2-14: „Mastermix“

Lösung	Menge
SYBR®-Green Mix (siehe Tabelle 2-9)	5 μ l
cDNA (1:10 verdünnt aus Abschnitt 2.2.1.2)	2 μ l
Bidestilliertes Wasser	1 μ l

Tabelle 2-15: „Lightcycler“ Programm für TRPC-Oligonukleotide

Zyklen	Titel	Temperatur	Zeit
1	Aktivierung	94 °C	15 min
45	Denaturierung	94 °C	10 s
	„Annealing“	55 °C	10 s
	„Elongation“	72 °C	10 s
1	Schmelzkurve	Kontinuierlich steigend 65 °C – 95 °C	1 min

Tabelle 2-16: Lightcycler Programm für Oligonukleotide der Fibrosemarker

Zyklen	Titel	Temperatur	Zeit
1	Aktivierung	50 °C	2 min
		95 °C	5 min
45	Denaturierung	95 °C	5 s
	„Annealing“	59 °C	5 s
	„Elongation“	72 °C	5 s
1	Schmelzkurve	Kontinuierlich steigend 60 °C – 95 °C	1 min

2.2.1.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Durch die Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, da kleinere Fragmente schneller durch das Agarosegel wandern als große.

Die Prozentigkeit des Agarosegels kann so angepasst werden, dass eine möglichst gute Auftrennung der DNA erfolgt; für kleine DNA-Fragmente wählt man bis zu 2% Agarose und für große Fragmente 0,7% - 1%. Durch die Zugabe von 6x Ladepuffer („DNA GeneRuler“), der Glycerin mit einer hohen Dichte enthält, wird eine Diffusion der Proben aus den Geltaschen verhindert, während durch Xylencyanol und Bromphenolblau die Lauffront der DNA farblich sichtbar gemacht wird. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA, die dann unter UV-Licht sichtbar wird.

Die gewünschte Menge an Agarose wurde in 1xTAE Puffer gelöst und in der Mikrowelle erhitzt bis eine klare Lösung entstanden war. Nach dem Abkühlen (ca. 50-60 °C) wurde ein Tropfen Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Nun wurde das Gel in die Gießvorrichtung gegossen, eventuell entstandene Luftblasen mit einem Spatel zerstört und der Gelkamm eingesetzt. Nach Aushärtung des Gels konnten der Größenmarker (3 µg) und die Proben aufgetragen werden. Die Elektrophorese lief bei 120 V konstant (ca. 300 mA) für ca. 1,5 h (abhängig von der Auftrennung). Das

Gel wurde durch ein UV-Dokumentationssystem betrachtet, ausgewertet und die Bilder am PC gespeichert.

In dieser Arbeit wurde die DNA-Agarosegelelektrophorese verwendet, um die amplifizierten DNA-Produkte aus der RT-qPCR zu überprüfen.

2.2.2 Zellbiologie

2.2.2.1 Zellkultur

Alle Experimente mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert (z.B. Vorratsgefäße, Glaspipetten) oder waren steril verpackt. Die verwendeten Zellen (siehe Tabelle 2-2: Zellen) wachsen adhärent, das heißt sie haften am Boden der Kulturschale und bilden eine einlagige Zellschicht. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert.

2.2.2.2 Medienwechsel und Passagierung

Das Medium der Zellen musste, abhängig von ihrer Dichte, alle 2-4 Tage gewechselt werden. Dabei wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und anschließend durch neues Medium ersetzt.

Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 80-90% erreicht hatten, mussten sie passagiert werden (sog. „Splitten“). Hierfür wurden die Zellen zunächst 1-3x mit warmen 10 ml PBS gewaschen und dann für 5-10 min mit 3 ml einer 1%igen Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank vom Boden der Kulturschale abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum abgestoppt und die Zellsuspension 5 min bei 1200 Umdrehungen pro Minuten in einem 50 ml Falcon zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einer entsprechenden Menge an warmen Medium aufgenommen. Je nach Bedarf wurden die Zellen in neue Kulturschalen, mit vorgelegtem warmen Medium, aufgeteilt und im Brutschrank weiter kultiviert.

2.2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen

Zellen können über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Um Zellen einzufrieren wurden sie, wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben, vom Boden abgelöst und abzentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde das Einfriermedium

hergestellt (20% DMSO, 40% FCS ad 100% in Kulturmedium). Nun wurde das Zellsediment entsprechend der einzufrierenden Zellzahl in frischem Kulturmedium aufgenommen. In einem 1 ml Kryogefäß wurde die Zellsuspension 1:1 mit dem Einfriermedium gemischt, sofort in eine Kryokonservierungsbox gegeben und bei -80 °C für 48 h tiefgefroren. Zur längeren Aufbewahrung wurde das Kryogefäß in den flüssigen Stickstofftank überführt.

Um die Zellen wieder aufzutauen wurde das Kryogefäß aus dem Stickstofftank entfernt und umgehend im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sofort wurde die Zellsuspension in warmen Kulturmedium aufgenommen und bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen aus dem Sediment wurden in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen, in eine entsprechende Kulturschale überführt und kultiviert.

2.2.2.4 Isolierung primärer Lungenfibroblasten

Die Isolierung von primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) wurde nach einem Protokoll für humane Lungenfibroblasten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. O. Eickelberg/CPC München durchgeführt (Staab-Weijnitz et al. 2015). Es wurde wie folgt vorgegangen:

Je Zellisolation wurde eine Maus verwendet, die durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion einer Mischung aus Ketamin [100 mg/kg KG] und Xylazin [0,7 mg/kg KG] narkotisiert wurde. Anschließend wurde das Abdomen geöffnet, die *Vena cava* durchgeschnitten und die Lunge und Trachea freigelegt. Die Lungen wurden über den rechten Herzventrikel mit ca. 15 ml kaltem, sterilem PBS gespült, bis die Lunge komplett weiß war. Nun wurden die Lungenflügel entnommen und in eiskaltes PBS in ein 50 ml Probengefäß überführt, in eine 10 cm Kulturschale mit 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium gelegt und mit einem Skalpell in 1-2 mm² kleine Stücke zerkleinert. Die Lungenstückchen wurden nun in ein 50 ml Probengefäß überführt, 50 µl Kollagenase [5 mg/50 µl] zugegeben und bei 37 °C für 1-2 h auf einem Schüttler mit 250 Umdrehungen pro Minute verdaut. Die verdauten Lungenstückchen mit Medium wurden nun durch einen 70 µm Nylonfilter in ein 50 ml Probengefäß gedrückt, der mit 10-20 ml warmen, sterilem PBS gespült wurde. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C für 5 min bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, die Zellen aus dem Sediment in Kulturmedium aufgenommen, in eine 10 cm Kulturschale überführt und wie in Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschrieben

kultiviert. Nach 2 Tagen konnten die Zellen zum ersten Mal kontrolliert werden. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatten konnten sie 1:3 passagiert werden. Für die Versuche in dieser Arbeit wurden Zellen der Passage 3-8 verwendet (ab Passage 2 sind kontaminierende Zellen, wie z.B. Epithelzellen, Macrophagen, etc. abgestorben).

2.2.2.5 Behandlung der Zellen mit TGF- β_1

Sobald die Zellen ca. 80% konfluent waren wurde das Medium durch DMEM-F12-Medium mit nur 0,1% FCS ausgetauscht (sog. „starving“ = hungern). Anschließend konnten die Zellen mit TGF- β_1 [2 ng/ml] im gleichen Medium behandelt werden und wurden nach 48 h für die RNA- (Abschnitt 2.2.1.1) oder Protein-Isolierung (Abschnitt 2.2.3.1) verwendet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit 0,1% BSA/PBS (Lösungsmittel von TGF- β_1) behandelt worden waren. Für die Immunfluoreszenz-Analyse wurden die Zellen auf Glasplättchen ausgesät und wie oben beschrieben behandelt.

2.2.3 Proteinbiochemie

2.2.3.1 Proteinisolierung

Proteinisolierung aus Zellen

Um die Proteine aus Zellen zu isolieren wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren (ca. 200 – 500 μ l für eine 10 ml Kulturschale), mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Die Suspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde anschließend 60 min auf Eis gestellt und dabei mehrmals auf einem sog. „Vortex“ gemischt und bei -20 °C gelagert.

Proteinisolierung aus Gewebe

Um die Proteine aus Lungengewebe zu isolieren wurde zunächst das Pulver (siehe Abschnitt 2.2.5.4) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß abgewogen und in entsprechender Menge an RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor (75 mg Gewebe + 750 μ l RIPA+PI) homogenisiert. Anschließend wurde wie bei der Proteinisolierung aus Zellen verfahren.

Isolierung der nukleären Fraktion

Um den Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor of activated T-Cells* (NFAT) nachweisen zu können mussten Zellkerne separiert werden. Die nukleäre Fraktion wurde mittels eines „*Nuclear Extraction Kits*“ (Firma Active Motif) nach Anweisung des Herstellers isoliert. Zunächst wurden die Zellen mit eiskaltem PBS-Puffer mit Proteaseinhibitoren gewaschen (um weitere Proteinmodifikationen zu verhindern, wie z.B. Expression, Dephosphorylierung, etc.). Nun wurden die Zellen durch die Inkubation in einem hypotonen Puffer lysiert. Durch die Zugabe des Detergens gingen zytoplasmatische Proteine in den Überstand über und nach einer Zentrifugation konnte die zytoplasmatische Fraktion abgenommen werden. Anschließend wurden die Zellkerne im Sediment lysiert und die nukleären Proteine in einem detergent-freien Lyse-Puffer mit Protease-Inhibitoren in Lösung gebracht. Es konnte wieder zentrifugiert werden und der Überstand als nukleäre Fraktion abgenommen werden. Die beiden Fraktionen wurden bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration des Proteinlysats wurde mittels „*BCA Protein Assay Kit*“ (Firma Pierce) bestimmt. Proteine reduzieren in alkalischer Umgebung Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen (Biuret Reaktion), die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen Chelatkomplex im Verhältnis 1:2 eingehen (Smith et al. 1985). Dieser Komplex hat eine intensive violette Farbe und lässt sich bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm messen. Die Intensität des Farbkomplexes ist direkt proportional zur Proteinmenge. Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde bei jedem Versuch ein im Kit mitgelieferter BSA-Standard mitvermessen.

2.2.3.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (*engl. Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamidegelectrophoresis*) trennt Proteine entsprechend nach ihrem Molekulargewicht auf. Die Methode basiert auf einer diskontinuierlichen Elektrophorese, bestehend aus einem Tris-Chlorid/Tris-Glycin-System und einem Sammel- und Trenngel. Das Verfahren setzt sich aus der Gelherstellung, der Probenvorbereitung, der Elektrophorese, der Proteinfärbung und der Analyse des erzeugten Bandenmusters zusammen.

Gelherstellung

Die Porengröße des Polyacrylamid-Gels ist - ähnlich dem Agarosegel - variabel und kann an die aufzutrennenden Proteine angepasst werden. Das durch das SDS denaturierte und negative geladene Protein wandert nach Anlegen eines elektrischen Feldes im Gel zur Anode, wobei kleine Proteine schneller laufen als große. Zuerst wurde das Trenngel (zur Auftrennung der Proteine) in die entsprechende Apparatur gegossen. Nach der Polymerisation wurde dann das Sammelgel (zur Konzentrierung der Proteine, um einen gleichen Startzeitpunkt der Auftrennung für alle Proteine zu garantieren) eingefüllt und ein 10-Taschen-Kamm eingebettet.

Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurde dem Proteinlysats aus Abschnitt 2.2.3.1 6x Lämmli-Puffer hinzugefügt, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Das Lysat wurde nun 10 min bei 95 °C und 300 Umdrehungen pro Min. gekocht und anschließend für 10 min im Ultraschallbad behandelt, um die visköse genomische DNA zu fragmentieren. Anschließend wurde die Probe aufgetragen oder bei -20 °C aufbewahrt.

Elektrophorese

Das gegossene und vollständig polymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer gestellt, die mit Laufpuffer aufgefüllt wurde. Nachdem der Kamm aus dem Gel entfernt worden war, wurden Proteinmarker (10 µl) sowie die Proben (maximal 25 µl, je nach Proteingehalt) in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese lief bei konstant 20 mA (pro Gel) bis die gewünschte Auftrennung erreicht war (Kontrolle über die farblich markierten Markerproteine).

Tabelle 2-17: Herstellung SDS-Trenngel

Lösung	10% SDS-Trenngel (pro Gel)
Acrylamid 30%	5 ml
4 x Tris/SDS pH 8,8 (siehe Abschnitt 2.1.6)	3,75 ml
Millipore-H ₂ O	6,125 ml
10% APS in H ₂ O	100 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	20 µl

Tabelle 2-18: Herstellung SDS-Sammelgel

Lösung	Sammelgel (pro Gel)
Acrylamid 30%	0,65 ml
4 x Tris/SDS pH 6,8 (siehe Abschnitt 2.1.6)	1,25 ml
Millipore-H ₂ O	3,05 ml
10% APS in H ₂ O	50 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	10 µl

2.2.3.4 Western-Blot und Immundetektion

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch elektrischen Transfer auf eine mit Wasser benetzte Nitrozellulosemembran oder eine mit Methanol benetzte PVDF-Membran in einem Tank mit Transferpuffer (Tabelle 2-8) übertragen. Zur Überprüfung des Transfers wurde eine Färbung mit Ponceau-S („Ready-to-use“-Lösung) durchgeführt. Anschließend wurde die Membran in 5% Milchpulver in PBST für 1h geblockt und über Nacht mit dem Erstantikörper (ca. 17-20 h) bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nachdem 3x kurz und 3x 5 min mit PBST gewaschen worden war, wurde die Membran mit einem gegen den F_c-Teil des Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper, an den die Peroxidase gekoppelt ist, entsprechend der Herstellerangabe inkubiert. Alle Antikörper wurden entsprechend der Tabelle 2-12 und Tabelle 2-13 in 5% Milchpulver in PBST verdünnt. Nach 3 kurzen und 3x 5 minütigen Waschschritten in PBST konnte das Chemolumineszenzsignal nach Inkubation mit einem entsprechenden Substrat

(siehe Chemilumineszenzsubstrate Tabelle 2-9) abhängig von der Signalintensität an einem Odyssey®Fc-Gerät der Firma LI-COR detektiert werden.

2.2.3.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät, sobald sie eine Konfluenz von 80-90% erreicht hatten 3x mit PBS gewaschen und anschließend durch die Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 10 min bei RT fixiert. Das PFA wurde schrittweise durch PBS ersetzt und anschließend 3x mit PBS gewaschen. Die Zellen konnten in PBS für maximal 1 Woche bei 4 °C gelagert werden.

Die Zellen wurden in 0,1% Triton X-100/PBS für 10 min permeabilisiert, 6x mit 0,1% BSA (Bovines Serumalbumin; 0,1% BSA/PBS) gewaschen und unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine 10-minütige Inkubation mit 4% BSA/4% Ziegen Serum/PBS geblockt. Nun wurden die Zellen mit dem Erstantikörper, der entsprechend der Tabelle 2-12 in 2% BSA/PBS verdünnt wurde, bei 4 °C über Nacht in einer feuchten, dunklen Kammer inkubiert.

Vor der Inkubation mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper wurde wieder 6x mit 0,1% BSA/PBS gewaschen. Der Zweitantikörper wurde entsprechend Tabelle 2-13 in 2% BSA/PBS verdünnt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Es wurde wieder 6x in 0,1% BSA/PBS gewaschen und die Zellkerne mit dem Hoechst-Farbstoff (Verdünnung siehe Abschnitt 2.1.6) für 10 min in einer dunklen, feuchten Kammer bei RT angefärbt. Wenn eine Färbung des Aktinzytoskelettes gewünscht war wurde vor der Färbung mit Höchst 10 min mit dem Knollenblätterpilzgift TRITC-Phalloidin (Verdünnung siehe Tabelle 2-12) das filamentöse Aktin angefärbt. Anschließend wurden die Zellen 6x in 0,1% BSA in PBS und 1x in Millipore Wasser gewaschen. Die Glasplättchen wurden mit Hilfe des „DAKO Fluorescent Mounting Medium“ (Firma DAKO) auf Objektträger aufgeklebt und im Dunklen über Nacht bei 4 °C getrocknet.

Auswertung der Graustufenintensität

Die Immunfluoreszenzfärbung konnte mittels des Computerprogramms der Firma Olympus quantitativ ausgewertet werden. Hierfür wurden die aufgenommenen Bilder zunächst in Graubilder umgewandelt und anschließend der Messbereich durch die Markierung der Zellmembran definiert. Der Mittelwert der Grauwertintensität jeder

einzelnen Zelle wird vom Programm berechnet. Ein Beispiel für die Auswertung ist in **Abbildung 16** gezeigt.

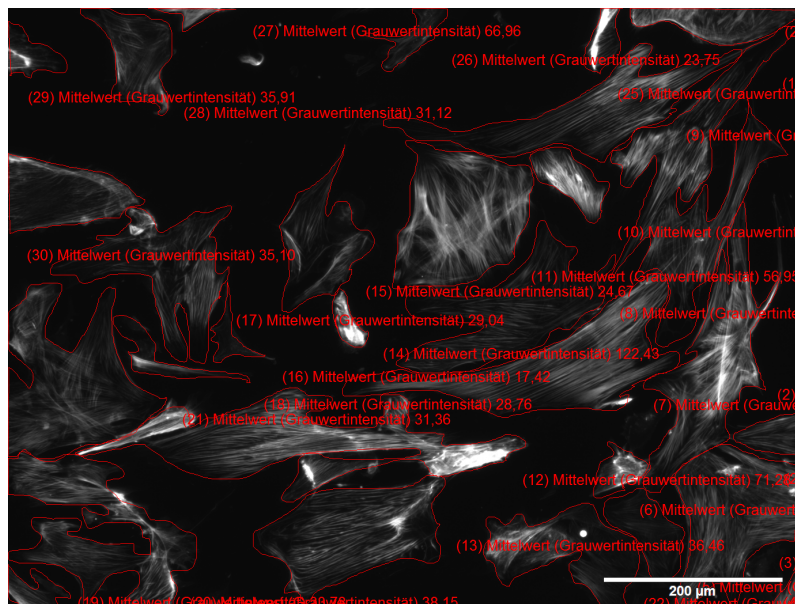


Abbildung 16: Repräsentatives Bild für eine Graustufenauswertung nach Immunfluoreszenzfärbung.

2.2.3.6 Quantitative Collagenbestimmung durch „High-Pressure-Liquid-Chromatography“ (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist eine Analysetechnik zur Quantifizierung weniger Picogramm einer Substanz in löslichen Stoffgemischen. Über eine Vergleichsanalyse mit Referenzstandards (spezifische Retentionszeiten und substanzspezifischen UV-Signale) bei gleichen Analyseparametern ist eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung der gesuchten Substanz möglich. Für bestimmte Anwendungen ist es jedoch erforderlich sowohl den Analyten (Probe) als auch die Standardsubstanz vorab zu derivatisieren, um genügend UV-Absorption zu gewährleisten.

Abbildung 17 zeigt einen schematischen Aufbau einer HPLC-Anlage: Die Mobile Phase nimmt die lösliche Probe auf. Das Stoffgemisch wird über eine Hochdruckpumpe über die Trennsäule aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix aufgetrennt. Ein Detektor analysiert die Auftrennung anhand der Retentionszeit und Anregungswellenlänge und gibt das Ergebnis an einem Computer (PC) aus.

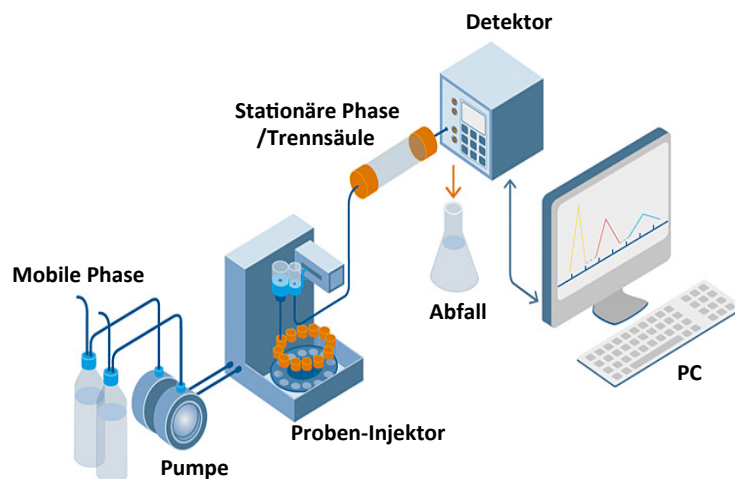


Abbildung 17: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage. Beschreibung siehe Text. (verändert nach TheLindeGroup 2016).

In dieser Arbeit wurde die HPLC-Technik eingesetzt, um die Kollagen-Menge im Lungengewebe anhand seines Hydroxyprolingehalts indirekt zu bestimmen. Eine Derivatisierung des Hydroxyprolins (HYP) mit NBD-Cl (4-Chlor-7-Nitrobenzofurazan) war dazu erforderlich, da die Substanz keine Chromophoren (UV-anregende Molekülstrukturen) enthält (siehe **Abbildung 18**). Das Hydroxyprolin (HYP) ist ein Hauptbestandteil des Kollagens (Ricard-Blum 2011) und kann deswegen zur Quantifizierung dieses extrazellulären Matrixproteins herangezogen werden. Es wurde das Protokoll von J.S. Campa et al (Campa et al. 1990) modifiziert nach SE. Mutsaers et al (Mutsaers et al. 1998) durchgeführt:

Hydrolyse

Zunächst musste das Hydroxyprolin (HYP) aus dem Kollagen isoliert werden. Dies geschah über eine saure Hydrolyse. Hierzu wurden 10 mg pulverisiertes Lungengewebe (siehe Abschnitt 2.2.5.4) in 2 ml 6 M HCl homogenisiert und für 16 h bei 110 °C hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde für 2 min bei 8.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand mit dem HYP in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das hydrolysierte HYP kann 1 Monat bei -80 °C gelagert werden.

Derivatisierung

Ein Teil (100 µl) des Überstandes wurden in ein braunes lichtundurchlässiges 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 55-60 °C mit offenem Deckel getrocknet, um die Salzsäure (HCl) zu entfernen. Das getrocknete HYP wurde dann in 100 µl Millipore-H₂O gelöst und mit 100 µl der 0,4 M Natriumtetraborat-Lösung und 100 µl der 12 mM NBD(4-Chloro-7-Nitrobenzofurazan)-Cl-Lösung bei 37 °C für 20 min bei 300 Umdrehungen pro Minute derivatisiert (siehe **Abbildung 18**). Die chemische Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1,5 M HCl abgestoppt. Dann wurden zu dem Reaktionsgemisch 150 µl 167 mM Natriumacetat hinzugegeben. Wegen seiner Lichtempfindlichkeit ist das Derivat nur für ca. 60 min stabil und sollte zeitnah vermessen werden, weswegen immer nur drei Proben gleichzeitig derivatisiert werden konnten.

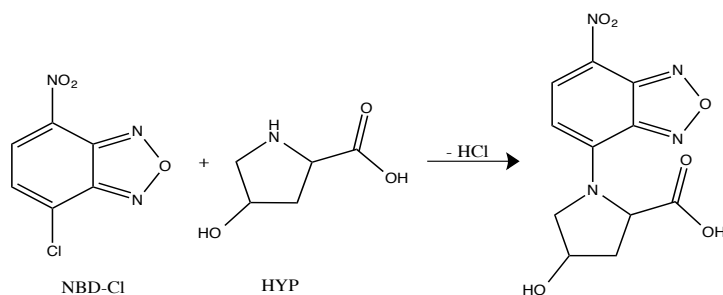


Abbildung 18: Derivatisierung von Hydroxyprolin: Reaktionsmechanismus von NBD-Cl und Hydroxyprolin (HYP). Unter Abspaltung von Salzsäure (HCl) entsteht ein Derivatisierungsprodukt, welches bei einer Wellenlänge von 495 nm detektiert werden kann.

Messung

Die Proben wurden an einem LaChrom Elite HPLC/UV-DAD System an einer Umkehrphasensäule (Reversed Phase/RP-18) mit einer Porengröße von 5 µm vermessen. Die Messungen der NBD-Cl-Derivate wurden anhand eines Acetonitril-Puffergemisches im Gradientenmodus durchgeführt (siehe Tabelle 2-19). Die Detektion der NBD-Cl-Derivate erfolgte durch ein strukturspezifisches UV-Signal bei einer Absorptionswellenlänge von 495 nm.

Tabelle 2-19: Chromatographie Bedingungen für die Bestimmung von Hydroxyprolin durch HPLC

Säule	LiChrospher, 60 RP-18 select B, 125x4 mm, 5 µm	
Mobile Phasen	A – 8% Acetonitril (v/v) in 50 mM Natriumacetat (pH 6,4)	
	B – 75% Acetonitril (v/v) in Millipore-H ₂ O	
Flussrate	1,00 ml/min	
Temperatur	40 °C	
Detektion	495 nm	
Gradient	Zeit (min)	% B
	0	0
	5	5
	6	80
	12	80
	12,5	0
	25	0
Probensammlung	15 s zwischen 3,5 und 7 min	

Quantifizierung

Eine Standardkurve in einem Messbereich von 0 bis 1,5 µg HYP wurde angefertigt (siehe **Abbildung 19**). Der HYP-Gehalt der Kollagen-Proben wurde über den Vergleich der Flächen („Area under the Curve“ (AUC)) der Standardkurve mit den erhaltenen AUC-Werten der jeweiligen Probe berechnet (siehe **Abbildung 20**). Die Reproduzierbarkeit der Standardkurve wurde an den Messtagen über 3 Stichproben überprüft.

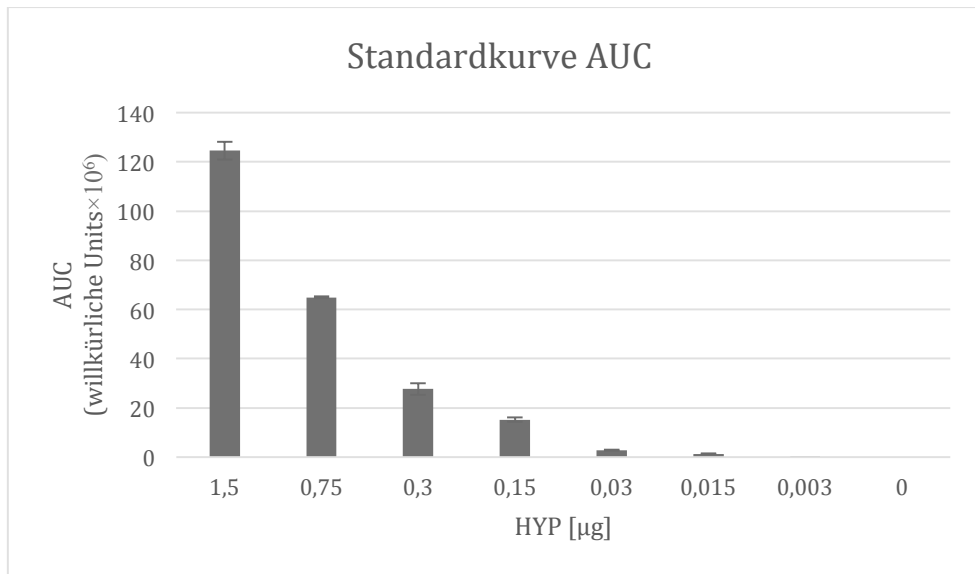


Abbildung 19: Balkendiagramm der „Area-Under-the-Curve“ (AUC)-Werte der Hydroxyprolin-Standardkurve. HYP: Hydroxyprolin

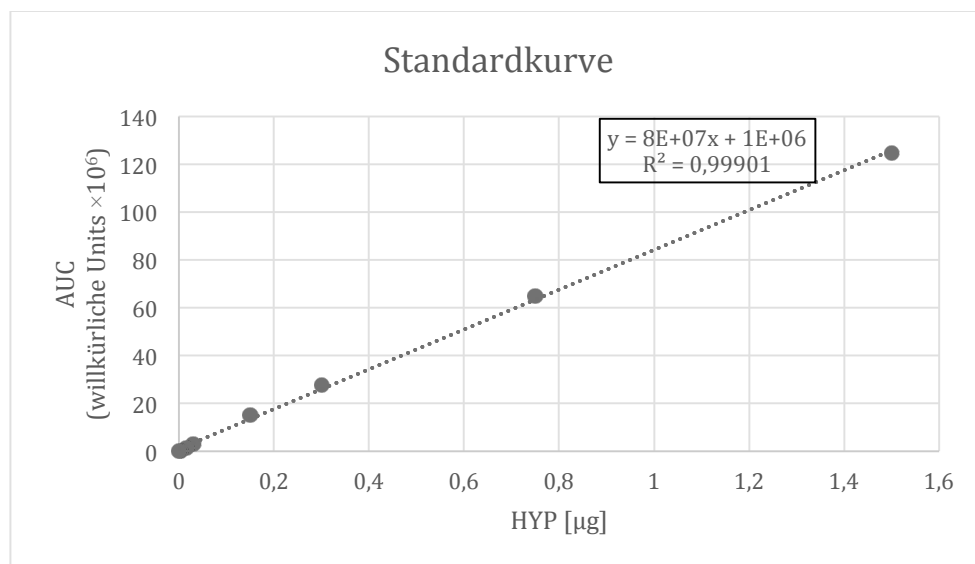


Abbildung 20: Standardkurve für Hydroxyprolin. Im Kasten rechts oben ist die Steigungsgerade der Standardkurve aufgeführt. R^2 : Bestimmtheitsmaß der Gerade; AUC: „Area-under-the-Curve“; HYP: Hydroxyprolin

2.2.4 Funktionelle Messmethoden

2.2.4.1 Kontraktionsassay

Die mechanische Kontraktion der extrazellulären Matrix (EZM), die sich bei der Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten ausbildet, kann in einem dreidimensionalen Kollagengel quantifiziert werden. Die Fibroblasten wurden in einer Kollagenmatrix ausgesät und mit TGF- β_1 oder Lösungsmittelkontrolle behandelt. In der Anfangsphase führten die Zellen in dem Gel zu einer „gestressten Matrix“ („stressed matrix“/mechanische Aufladung). Anschließend wurde die Matrix von den Gefäßwänden gelöst, was zur Kontraktion der Matrix führte (mechanische Entladung). Diese Kontraktion konnte dann quantifiziert werden. **Abbildung 21** zeigt schematisch den Ablauf des Versuches.

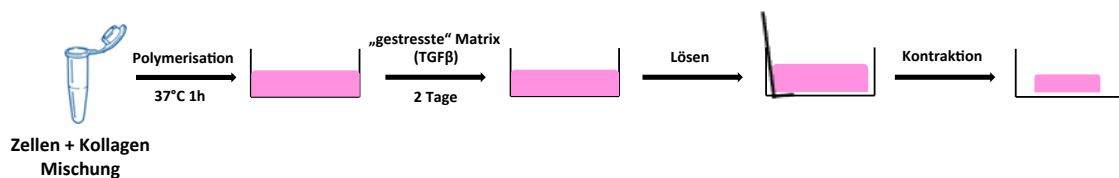


Abbildung 21: Schematischer Ablauf des Kontraktionsassays. Die Zellen werden in einer Kollagenmischung (rosa Quader) ausgesät. Nach Polymerisation des Gels wird Zellkulturmedium mit entsprechendem Agonist zugegeben. Nach zwei Tagen kann das Gel von der Kulturschalenwand gelöst werden und die Kontraktion über einen definierten Zeitraum beobachtet und vermessen werden.

Das Protokoll ist eine Kombination der Herstelleranleitungen des „Cell Contraction Assays“ (Cell Biolabs, Inc.) und des „PureCol-Assays“ (Advanced BioMatrix). Es wurde wie folgt vorgegangen:

Herstellung der Kollagenlösung

Zu 8 Teilen gekühlter Kollagenlösung (PureCol®) wurde 1 Teil steriles 5x DMEM (0,5 Teile kaltes Millipore-Wasser und 0,5 Teile 10x DMEM) gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde der pH der Mischung mit steriler 0,1 M NaOH auf 7,2-7,6 eingestellt und das Volumen mit Millipore-Wasser auf 10 Teile aufgefüllt. Um die frühzeitige Polymerisation der Kollagenmatrix zu verhindern musste die Temperatur zwischen 2-10 °C gehalten werden.

Aussaat der Zellen

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben abgeerntet und in „Starving Medium“ in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml resuspendiert.

Versuch

Für die Kollagenmatrix wurden 8 Teile der kalten Kollagenlösung mit 2 Teilen der Zellsuspension gemischt. Je Well einer 24-well Platte wurden nun 500 µl der Zell-Kollagen-Mischung ausgesät und etwa 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem das Kollagengel auspolymerisiert war, wurde je Loch einer 6-Lochplatte 1 ml Zellkulturmedium auf die Matrix pipettiert und für 2 Tage inkubiert. Im Zellkulturmedium befand sich je nach Versuchsaufbau TGF- β_1 oder die Kontrolle (0,1% BSA in PBS als Lösungsmittel von TGF- β_1). In den 2 Tagen konnten sich die Fibroblasten zu Myofibroblasten umwandeln und das Gel „stressen“. Dreißig Minuten bevor die Matrix von den Wänden gelöst wurde, konnte ein Inhibitor der Kontraktion (10 µM BDM/2,3-Butandionmonoxim; Myosin-ATPase-inhibitor) in das Medium pipettiert werden.

Um nun die Kontraktion auszulösen wurde das Gel vorsichtig mit einem Spatel von allen Gefäßwänden gelöst. Die Veränderung der Gelgröße konnte nun zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und anschließend mit ImageJ quantifiziert werden.

2.2.4.2 Messung des Zellwiderstands durch „Electric-Cell-substrate Impedance Sensing“ (ECIS)

Die morphologische Veränderung der Zellen nach Behandlung mit TGF- β_1 und dessen Einfluss auf den Zellwiderstand wurde mit Hilfe eines ECIS („Electric-Cell-Substrate Impedance sensing“) -Geräts (Applied Biophysics, Troy/NY, USA) gemessen.

Die Eigenschaft einer Zelle bzw. eines Zellrasens in einem angelegten elektrischen Feld als Widerstand zu wirken hängt von der Zellbeschaffenheit (Oberfläche, Zytosol, Plasmamembran) und der freigesetzten extrazellulären Matrix (EZM) ab. Durch die Zugabe von TGF- β_1 kommt es zu Veränderungen des zellulären Zytoskeletts (α SMA-/Fn1-/Coll1 α 1-Produktion) und zur EZM-Produktion, woraus sich eine Veränderung des Zellwiderstands ergibt. Der Widerstand kann mit dem ECIS-Gerät gemessen werden.

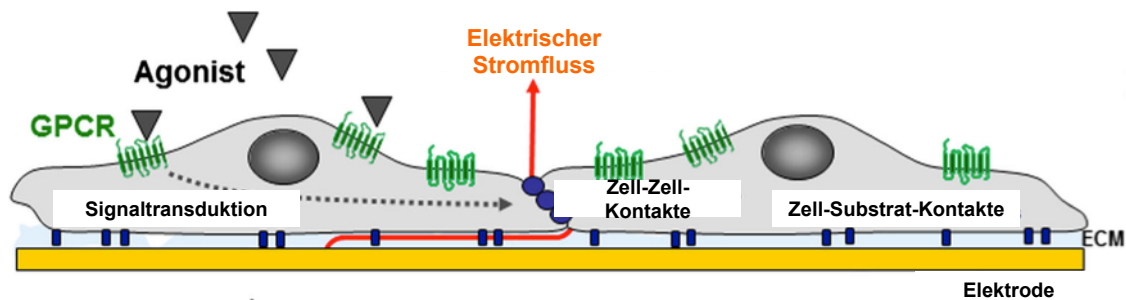


Abbildung 22: Schematische Darstellung der ECIS-Methode. Die Zellen wachsen konfluent auf einer ECIS-Elektrode an. Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) durch einen Agonisten führt zu einer Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden. Diese wiederum haben Einfluss auf interzelluläre (Zell-Zell-Kontakte) bzw. intrazelluläre (Zell-Substrat-Kontakte; ECM Extrazelluläre Matrix) -Kontakte, d.h. Wechselwirkungen zwischen Zellen untereinander und zwischen Zellen und Elektrode. So können Veränderungen des zellulären Zytoskeletts mit dem ECIS-Gerät als Veränderungen des Stromes (elektrischer Stromfluss) gemessen werden. (verändert nach Stolwijk et al. 2015)

Versuchsaufbau

Die primär isolierten Lungenfibroblasten (pmLF) wurden wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben kultiviert. Die ECIS-Kammer (8W10E+; Applied Biophysics, Troy/NY, USA) wurde mit Cystein [10 mM] für 10 min bei RT und dann über Nacht (oder länger) mit FCS im Inkubator inkubiert („coating“). Anschließend wurden 200.000 Zellen je Kammer ausgesät und über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Vor der TGF-β₁-Behandlung wurde das Medium entfernt und durch „Starving-Medium“ ersetzt (0,1% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin in DMEM/F12). Nach 24 h „starving“ wurden die Zellen mit TGF-β₁ [2 ng/ml] bzw. mit Lösungsmittel (Kontrolle) stimuliert. Alle Experimente wurden in DMEM/F12-Medium mit 0,1% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin durchgeführt. Der Widerstand (Resistance/Ω) wurde über 48 h nach der TGF-β₁-Behandlung analysiert.

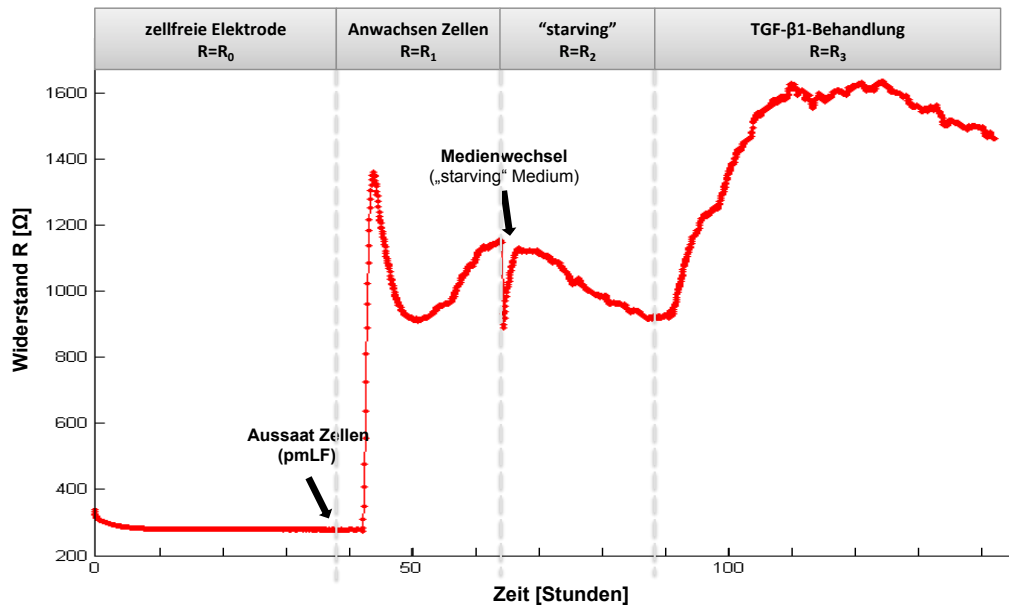


Abbildung 23: Beispiel für eine Messung des Zellwiderstands im ECIS-Gerät. Die zellfreie (mit Cystein und FCS gecoatete) Elektrode besitzt einen konstanten Widerstand (R_0). Durch das Absetzen und die Proliferation der Zellen steigt zunächst der Widerstand an und pendelt sich bei Erreichen der Konfluenz bei einem Wert ein (R_1). Nach Medienwechsel („Starving“) ergibt sich ein neuer Widerstandswert (R_2). Durch Manipulation der Zellen (Zugabe von TGF- β_1) wird erneut eine Veränderung des Widerstandes gemessen (R_3).

2.2.4.3 Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2

Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur funktionellen Charakterisierung von TRPC-Kanälen, ist über Ca^{2+} -Indikatoren möglich. Fura-2AM (Fura-2-acetoxymethylester) ist ein Ester des Farbstoffs Fura-2 und gelangt aufgrund seiner Lipophilie durch die Membran in das Zellinnere. Dort wird er durch intrazelluläre Esterasen in das hydrophile Fura-2 gespalten, was eine Rückdiffusion verhindert. Das Exzitationsmaximum des Fura-2 verschiebt sich durch die Bindung an Ca^{2+} von 380 nm auf 340 nm, unabhängig von der Beladungseffizienz der Zelle. Völlig Ca^{2+} -unabhängig ist die Anregung mit einer Wellenlänge von 360 nm (isosbestischer Punkt). Das Verhältnis von Ca^{2+} -freien Fura-2 zu Ca^{2+} -gebundenem Fura-2 (ratio F_{340}/F_{380}) kann als das Maß für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration berechnet werden und entspricht somit einem Ca^{2+} -Einstrom.

Versuchsablauf

Die Zellen wurden auf 25 mm Glasplättchen in einer 6-Lochplatte ausgesät und inkubiert bis sie ca. 80% konfluent waren. PmLF von mindestens drei unabhängigen

Zellisolationen (WT oder TRPC6^{-/-}) wurden analysiert. Für die TGF- β_1 -Behandlung wurde entsprechend dem Protokoll in Abschnitt 2.2.2.5 vorgegangen.

20 min vor der Messung wurden die Zellen mit HBSS-Puffer gewaschen und mit einer 5 μ M Fura-2AM-Lösung in 0,1% BSA/HBSS-Puffer für 20 min bei 37 °C beladen. Anschließend wurden die Plättchen mit HBSS gewaschen, in die Messapparatur eingespannt, vorsichtig mit 400 μ l HBSS-Puffer benetzt und die Messung gestartet. Nach 200 Zyklen wurde der TRPC6-Aktivator 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) in einer Endkonzentration von 100 μ M vorsichtig hinzugefügt.

Zur Messung diente ein inverses Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX 70) mit einem 20x Ölimmersionsobjektiv, das mit einem Monochromator (Polychrome II, TILL-Photonics, Martinsried, Deutschland) ausgestattet war. Die Fluoreszenzemission von Fura-2 bei 510 nm wurden mit einer 12-bit CCD-Kamera (Imago, TILL-Photonics, Martinsried, Deutschland) aufgenommen. Die „Ratio“ steht für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (F) des Fura2 bei Exzitationswellenlängen von 340 nm und 380 nm.

2.2.5 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.5.1 Intratracheale Instillation von Bleomycin bzw. PBS

Die Mausexperimente wurden nach den Richtlinien des Ethik-Komitees des Helmholtz Zentrums München durchgeführt und durch die Regierung von Oberbayern, Deutschland, genehmigt. Die Tierversuche wurden in Kooperation mit Dr. Dr. Melanie Königshoff (CPC München), Dr. Sarah Vierkotten (CPC München), Nadine Adam und Rabea Imker durchgeführt.

Für die Bleomycin-Applikation wurden weibliche C57BL/6 Mäuse im Alter zwischen 8-12 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden durch eine i.p. Injektion einer Mischung aus Medetomidin (500 μ g/kg KG), Midazolam (5 mg/kg pro kg KG) und Fentanyl (50 μ g/kg KG) narkotisiert (entsprechend dem Gewicht der Maus). Das Bleomycin (3 U/kg KG) wurde in 50 μ l sterilem PBS gelöst und durch eine 20 G INTROCAN-Safety® Kanüle (Firma Braun) intratracheal mit Hilfe eines Micro Sprayer® Aerosolizer, Model IA-1C (Penn Century, Wyndmoor, USA) appliziert. Kontrollmäuse erhielten 50 μ l steriles PBS. Nach der Instillation wurde die Narkose durch subkutane Injektion einer Mischung aus Atipamezol (2,5 mg/kg KG), Flumazenil (500

$\mu\text{g/kg KG}$) und Naloxon ($1200 \mu\text{g/kg KG}$) antagonisiert (entsprechend dem Gewicht der Maus). Die Narkose wurde regelmäßig anhand des Zwischenzehreflexes überprüft. Zum Schutz der Augen wurde Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Firma Bayer) auf die Augen der Tiere aufgetragen.

2.2.5.2 Lungenfunktion

Nach 7 oder 14 Tagen wurden die Mäuse durch eine i.p. Injektion einer Mischung aus Ketamin (100 mg/kg KG) und Xylazin ($0,7 \text{ mg/kg KG}$) (entsprechend dem Gewicht der Maus) narkotisiert. Heparin (1000 IU/kg KG) wurde der Injektionsnarkose als Antikoagulanzen hinzugefügt um eine Blutgerinnung zu verzögern. Die Lungenfunktionsmessung am narkotisierten Tier dient der direkten und exakten Messung von verschiedenen Parametern, wie zum Beispiel Lungenvolumina („Compliance“), Lungendehnbarkeit („Elastance“) und Atemwegswiderstand („Resistance“). Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde die Trachea freigelegt, die Maus durch eine kleine Inzision intratracheal intubiert und an die Lungenfunktionseinheit (flexivent System; Firma Scireq, Montreal, Kanada) zur Beatmung angeschlossen. Um einen Wärmeverlust zu vermeiden wurden die Tiere durch eine Wärmeplatte warm gehalten. Der Ventilator der Lungenfunktionseinheit simulierte nun verschiedene Atemmanöver um die obengenannten Parameter zu messen. Die jeweiligen Atemmanöver, Atemzugvolumen und Atempausen sowie die in- und expiratorische Atemstromstärke des Ventilators lassen sich über einen Computer steuern und wurden entsprechend der Lungengröße vorgegeben. **Abbildung 24** zeigt bildlich den Ablauf einer Lungenfunktionsmessung.

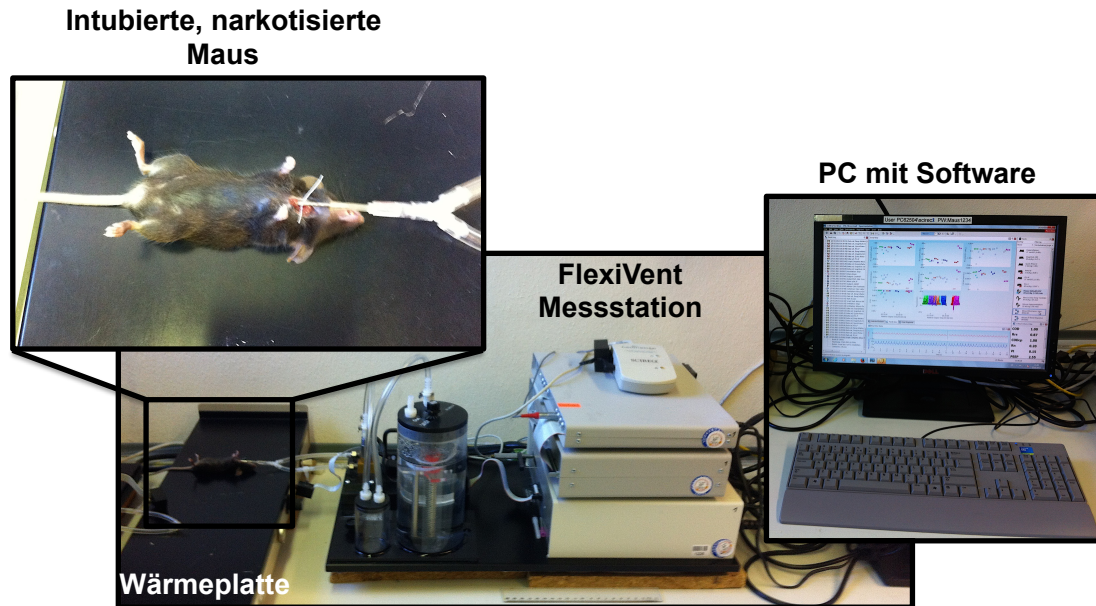


Abbildung 24: Lungenfunktionsmessung. Die Maus wird narkotisiert und durch eine kleine Inzision intratracheal intubiert (oberes linkes Bild). Die Flexi-Vent-Messstation sorgt für eine mechanische Beatmung mit definierten volumen- und druckkontrollierten Atemmanövern (mittleres Bild). Werte zur Atemmechanik wurden von der Software des Computers generiert (rechtes oberes Bild).

Anschließend wurden die Tiere für die bronchioalveoläre Lavage, Organ- bzw. Gewebeentnahme vorbereitet (siehe Abschnitt 2.2.5.3).

2.2.5.3 Bronchoalveoläre Lavage und Organ- bzw. Gewebeentnahme

Nach Beendigung der Lungenfunktionsmessung (siehe Abschnitt 2.2.5.2) wurde das Abdomen geöffnet und die Vena cava durchgeschnitten. Zweimal 500 µl steriles PBS wurde über den trachealen Tubus in die Lunge instilliert und wieder vorsichtig aspiriert. Die auf diese Weise gewonnene Lavageflüssigkeit (Bronchoalveoläre Lavage/BALF) wurde zusammengeführt und durch Zentrifugation für 5 min bei 500 x g gereinigt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren (BAL-Sediment und Überstand). Die Kanülen wurden von der Firma B. Braun (Melsungen) und alle Operationsbestecke von Fine Science Tools (Heidelberg) erworben. Das Lungengewebe wurde über den rechten Herzventrikel mit Kochsalzlösung gespült und die rechten Lungenflügel für RNA- und Proteinbestimmungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der linke Lungenflügel wurde mit 4% Paraformaldehyd (PFA) gefüllt und bei 4 °C für immunohistochemische Untersuchungen gelagert (siehe Abschnitt 2.2.5.5).

2.2.5.4 Pulverisieren des Lungengewebes

Die 4 übrigen Lungenflügel die für die RNA- bzw Proteinbestimmung präpariert wurden (siehe Abschnitt 2.2.5.3) wurden in einem Mikrodismembrator (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) homogenisiert. Hierfür wurden die tiefgefrorenen Lungenflügel zusammen mit einer rostfreien, autoklavierten Stahlkugel in ein Kryogefäß gegeben und bei 3.000 Umdrehungen pro Min. für 30 s im Mikrodismembrator homogenisiert. Um ein Auftauen des Lungengewebes zu vermeiden wurde das Homogenisat in flüssigem Stickstoff schockgefroren bevor es ein zweites Mal für 30 s und 3.000 Umdrehungen pro Min. geschüttelt wurde. Das gefrorene Pulver wurde bei –80 °C gelagert.

2.2.5.5 Histochemie

Das in Abschnitt 2.2.5.3 in Paraformaldehyd fixierte Lungengewebe wurde für histologische Färbungen verwendet, bei der Strukturen, wie z.B. Zellkerne, Immunzellen, Muskeln, Kollagen, etc., mit spezifischen Farbstoffen angefärbt werden. Die Histochemie wurde wie folgt von Rabea Imker am CPC München durchgeführt:

Die in Paraformaldehyd für 24 Stunden fixierten Lungengewebe wurden zunächst mit Leitungswasser gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 2-20) entwässert bevor sie in Xylol überführt und mit Paraffin eingebettet wurden.

Tabelle 2-20: Entwässerung des Lungengewebes

1.	10 min	destilliertes Wasser
2.	15-30 min	40% Ethanol
3.	15-30 min	70% Ethanol
4.	15-30 min	96% Ethanol
5.	15-30 min	Isopropanol
6.	2x 15 min	Xylol

Anschließend wurde das Gewebe mittels einer Gießstation in Plastik-Gussformen mit flüssigem Paraffin übergossen, ausgerichtet und zur Aushärtung ca. 30 min auf einer Kühlplatte bei 4 °C inkubiert und gelagert. Der Paraffinblock wurde an einem Rotationsmikrotom so eingespannt und getrimmt, dass das Gewebestück etwa mittig

lag. Es wurden Schnitte mit einer Dicke von ~ 3 µm geschnitten, in ein mindestens 40 °C warmes Streckbad überführt und dann auf den Objektträger gezogen. Die Schnitte wurden vor der Färbung über Nacht bei 37 °C getrocknet.

Da Paraffin nicht wasserlöslich ist muss es durch eine absteigende Alkoholreihe (unvergällter Ethanol) entfernt werden.

Tabelle 2-21: Entparaffinierung

1.	2x 5 min	Xylol
2.	2x 1 min	96% Ethanol
3.	1 min	90% Ethanol
4.	1 min	80% Ethanol
5.	1 min	70% Ethanol
6.	kurz spülen	Destilliertes Wasser

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden nun wie folgt gefärbt:

Hämatoxylin & Eosin (HE) - Färbung

Durch diese Färbemethode werden Zellkerne blau, Zytoplasma rosa, kollagene Bindegewebsfasern und Muskelgewebe rot, und Knorpel blau angefärbt. Die Gewebeschnitte wurden mit folgenden Lösungen behandelt:

Tabelle 2-22: Protokoll für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

1.	6 min	Mayer's Hämalan
2.	kurz	destilliertes Wasser
3.	15 min	fließendes Leitungswasser
4.	2 min	destilliertes Wasser
5.	10 min	Eosin Y (0,5%) (Zugabe von 1 Tropfen Essigsäure/100 ml)
6.	5 min	fließendes Leitungswasser

„Masson-Trichrom“-Färbung/“Trichrom Accustain“ nach Lillie

Durch diese Färbemethode werden Zellkerne braun-schwarz, Zytoplasma rosa, Kollagen und Knochen blau oder grün, Muskelfasern und Keratin rot angefärbt. Die Gewebeschnitte wurden mit folgenden Lösungen behandelt:

Tabelle 2-23: Protokoll für die Masson-Trichrom-Färbung

1.	15 min bei 56 °C oder über Nacht bei RT	Bouins-Lösung
2.	spülen	fließendes Leitungswasser
3.	5 min	Weigert's Eisenlack
4.	5 min	fließendes Leitungswasser
5.	kurz spülen	destilliertes Wasser
6.	5 min	Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin Lösung
7.	kurz spülen	destilliertes Wasser
8.	5 min	Phosphorwolfram-/ Phosphormolybdänsäure
9.	5 min	Anilinblau
10.	2 min	Essigsäure 1%
11.	kurz spülen	destilliertes Wasser

Anschließend wurden die gefärbten Gewebeschnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe wie in Tabelle 2-24 beschrieben entwässert und Deckgläschen mit Hilfe von Entellan® aufgeklebt.

Tabelle 2-24: Protokoll für die Entwässerung

1.	3x kurz	70% Ethanol
2.	3x kurz	80% Ethanol
3.	1 min	90% Ethanol
4.	1 min	96% Ethanol
5.	2 min	96% Ethanol
6.	2x 5 min	Xylol

Die gefärbten Gewebeschnitte konnten mit dem Mirax Scanner für weitere Untersuchungen eingescannt werden und mit der Panoramic Viewer Software (3DHistech, Budapest, Ungarn) ausgewertet werden.

2.2.6 Auswertung und Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Excel (Microsoft) und der GraphPad Software (GraphPad Prism) durchgeführt. Zur Erstellung einer Statistik wurden allgemein gültige Verfahren angewandt. Zunächst wurde auf eine Gaußsche-Normalverteilung getestet und sog. „Ausreißer“ mittels des ROUT-Tests aus den Messwerten entfernt. Anschließend wurden parametrische (two-tailed T-test) oder nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney-Test) durchgeführt. Die t-Tests wurden auf Varianz (F-Test) getestet und falls die Varianzen unterschiedlich waren, wurde eine „Welch's Correction“ durchgeführt. Der Fehler wurde stets als Standardfehler des Mittelwertes angegeben („standard error of the mean“ oder SEM).

Grafiken wurden zusätzlich mit Power Point (Microsoft) erstellt und Zellfotos neben den Programmen des Fluoreszenzmikroskopes (z.B. Graustufenauswertung der Immunfluoreszenzfärbungen (Olympus) auch mit ImageJ (NIH) bearbeitet. Die histologischen Schnitte wurden mittels des Mirax Scanners (Zeiss, Göttingen) eingescannt und mit dem Panoramic Viewer (3DHistech, Budapest, Ungarn) analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich von WT- und TRPC6-defizienten Mäusen in einem in-vivo Modell der experimentellen Lungenfibrose

Ziel dieses Projektes war es die Rolle des TRPC6-Ionenkanales während der Entwicklung einer interstitiellen Lungenerkrankung (Lungenfibrose) zu charakterisieren. Nach der intratrachealen Applikation von Bleomycin oder der Kontrollösung („Phosphate buffered saline“/PBS) in Wildtyp (WT) und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) Mäusen wurden für 14 Tage die Mortalität und das Gewicht der Mäuse dokumentiert. Am Tag 14 folgte eine Analyse der Lungenfunktion. Die Mäuse wurden getötet und die Lungenflügel für die Histologie und zur Analyse von mRNA und Proteinen entnommen (siehe **Abbildung 25** und Abschnitt 2.2.5).

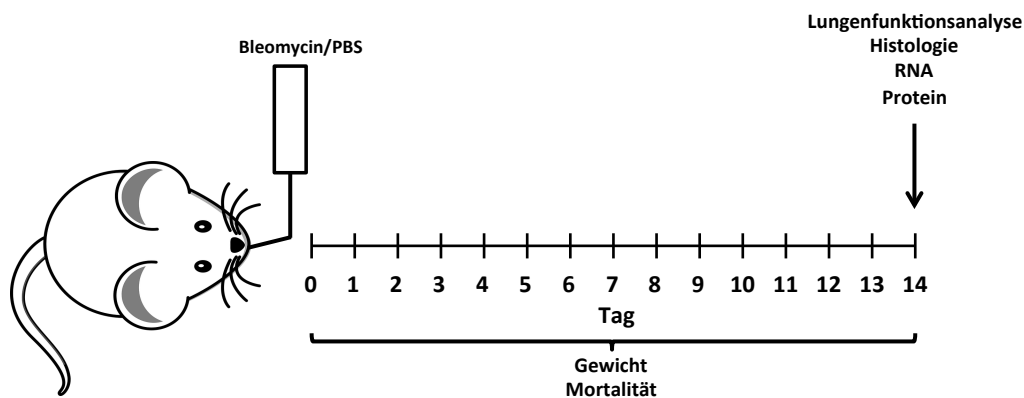


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf des in-vivo-Modells der experimentellen Lungenfibrose. Nach der intratrachealen Applikation von 50 μ l Bleomycin oder PBS wurden das Körpergewicht und die Mortalität über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Nach der Lungenfunktionsanalyse und Tötung der Maus am Tag 14 wurden die Lungenflügel für die Histologie, RNA- und Proteinanalyse entnommen.

3.1.1 Expression des TRPC6-Kanals in WT und TRPC6-defizienten Lungen

Zunächst wurde in der Lunge von WT und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) Mäusen die Expression des TRPC6-Kanals überprüft. Die **Abbildung 26** zeigt einen repräsentativen Western Blot von Gesamtlungenlysaten isoliert aus einer WT- und einer TRPC6-defizienten Maus. Mit dem spezifischen Antikörper für TRPC6 ist in der

WT-Lunge eine deutliche Bande für das TRPC6-Protein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa zu sehen, welche bei der TRPC6-defizienten Lunge fehlt. Als Ladekontrolle erkannte ein HRP-gekoppelter β -Aktin-Antikörper das Haushaltsprotein mit einer Größe von 43 kDa.

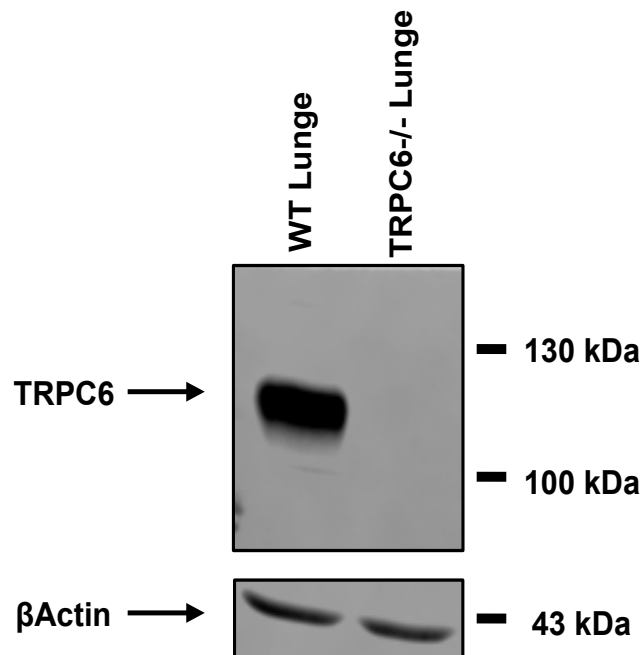


Abbildung 26: Nachweis des TRPC6-Proteins in Lungenlysaten von Wildtyp (WT)- und TRPC6-defizienten Mäusen durch „Immunoblotting“. Das TRPC6-Protein wurde in Lungenlysaten von WT- und TRPC6-defizienten Mäusen durch „Immunoblotting“ mit einem TRPC6-spezifischen Antiserum (siehe Abschnitt 2.2.3.4) nachgewiesen. In der WT-Lunge wurde durch den TRPC6-spezifischen Antikörper eine Proteinbande von 110 kDa sichtbar, die in der TRPC6-defizienten Lunge fehlte. Als Ladekontrolle wurde β -Actin gewählt.

3.1.2 Gewichtsverlauf und Überlebensrate von WT- und TRPC6-defizienten Mäusen

Um eine mögliche Beteiligung des TRPC6-Ionenkanals während der Ausbildung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in der Maus zu untersuchen wurden zunächst Wildtyp (WT)-Mäuse und Mäuse denen das TRPC6-Gen fehlt (TRPC6-/-) in diesem experimentellen Fibrose-Modell untersucht. Als Indikator für den Schweregrad des Krankheitsverlaufes während der initialen Entzündungsphase wurde das Körpergewicht der Mäuse analysiert. **Abbildung 27** zeigt den Gewichtsverlauf über vierzehn Tage nach Bleomycin/PBS-Applikation. Ab Tag 3 verloren die Bleomycin-behandelten Mäuse signifikant Gewicht (bis zu 20% des Anfangsgewichtes) während sich das Körpergewicht der PBS-Kontrollmäuse nicht

änderte. Ab Tag 7 pendelte sich das Körpergewicht der Bleomycin-behandelten Mäuse bei einem stabilen Wert (um ca. 80% des Ausgangsgewichtes) ein, der jedoch signifikant niedriger als der der Kontrollmäuse war. Zwischen den beiden Genotypen gab es weder unter den Bleomycin-behandelten noch unter den PBS-behandelten Kontrollmäusen einen signifikanten Unterschied.

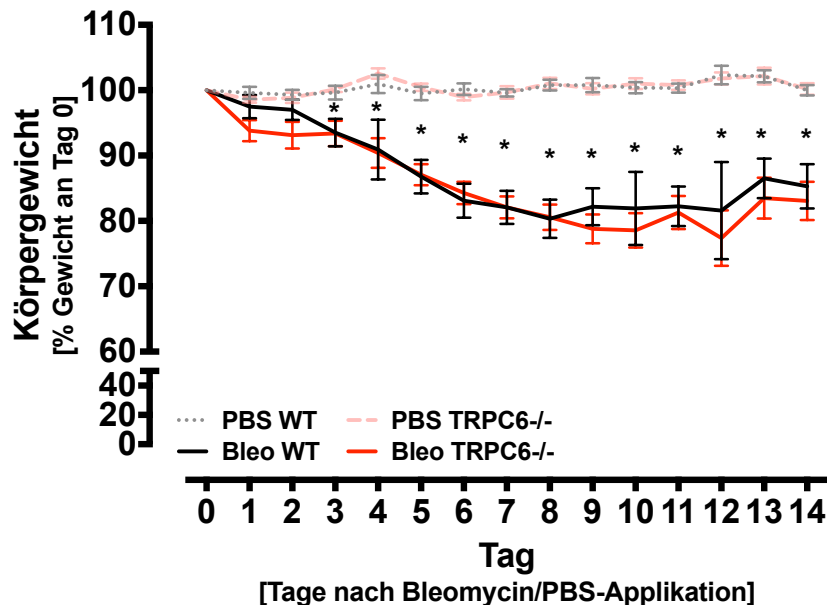


Abbildung 27: Körpergewicht der untersuchten Mäuse nach Bleomycin/PBS-Applikation. Analyse des Körpergewichtes der Mäuse nach intratrachealer Bleomycin- (WT, n=13; TRPC6-/-, n=10) oder PBS (WT, n=9; TRPC6-/-, n=8)-Applikation. Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 0 bis 14 Tagen gewogen. Statistische Analyse mittels Two-way ANOVA. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Der Schweregrad des Krankheitsverlaufes während der Ausbildung einer Lungenfibrose ab Tag 7 wurde durch die Analyse der Mortalität der Mäuse während des Versuchablaufes bestimmt. Erste Wildtyp (WT)-Mäuse starben ab Tag 7, also 4 Tage früher als die TRPC6-defizienten (TRPC6-/-)-Mäuse, nach intratrachealer Bleomycinapplikation.

Die Überlebenskurve nach Kaplan-Meier in **Abbildung 28** zeigt eine signifikant erhöhte Mortalität der WT-Mäuse nach Bleomycinapplikation im Vergleich zu den PBS-WT-Kontrollmäusen. Die Mortalität der TRPC6-defizienten Mäuse nach Bleomycinapplikation war jedoch im Vergleich zu den PBS-Kontrollmäusen nicht signifikant erhöht. Die PBS-Kontrollmäuse beider Genotypen zeigten eine Überlebensrate von 100%.

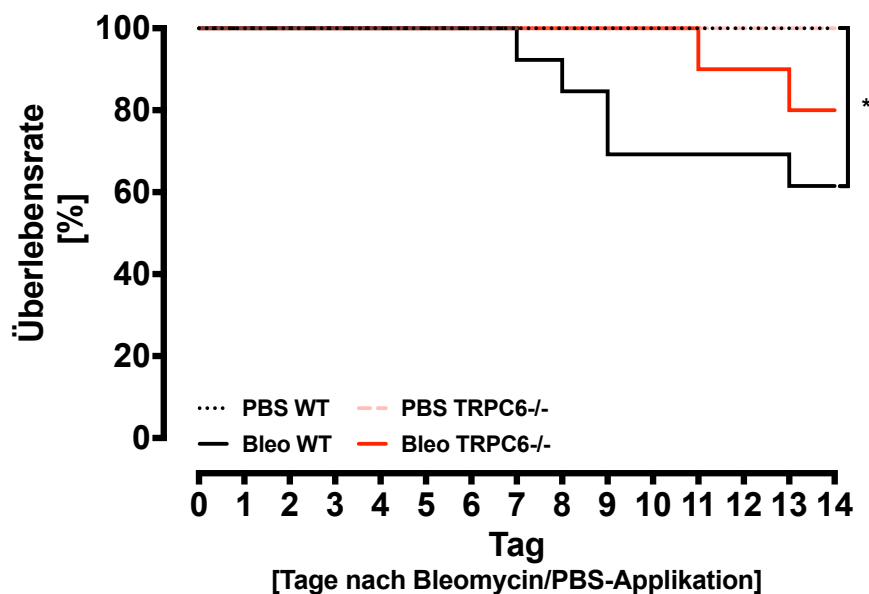


Abbildung 28: Überlebenskurve („Kaplan-Meier-Plot“) der WT- und TRPC6-defizienten Mäuse nach Bleomycin/PBS-Applikation. Grafische Darstellung der Mortalität (Sterberate) der Mäuse nach intratrachealer Bleomycin- (WT, n=13; TRPC6^{-/-}, n=10) oder PBS (WT, n=9; TRPC6^{-/-}, n=8) –Applikation. Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 0 bis 14 Tagen beobachtet. Für die statistische Auswertung der Überlebensrate wurde der log-rank (Mantel-Cox)-Test verwendet. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

3.1.3 Lungenfunktionsmessungen

Durch die Entwicklung einer Lungenfibrose wird die Lungenarchitektur zerstört und es kommt zu einer Einschränkung der Lungenfunktion. Atemwegswiderstand („Resistance“) und Lungendehnbarkeit („Elastance/Compliance“) als Lungenfunktionsparameter wurden bei den überlebenden Mäusen analysiert.

In **Abbildung 29** ist die **Resistance** als Maß für den Atemwegswiderstand der Bleomycin- und PBS-behandelten und unbehandelten WT- und TRPC6-defizienten Mäuse am Tag 14 nach der Applikation dargestellt. Die WT-Mäuse zeigten einen signifikanten Anstieg des Atemwegswiderstandes nach Bleomycinapplikation im Vergleich zu den PBS-Kontroll-Mäusen, während die Werte für die TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-})-Mäuse nach Bleomycinapplikation nicht signifikant unterschiedlich zu den Werten der PBS-Kontrolltiere beider Genotypen war. Vergleicht man die Werte der behandelten WT-Tiere mit denen der behandelten TRPC6-defizienten Mäuse ergibt sich auch hier ein signifikanter Unterschied.

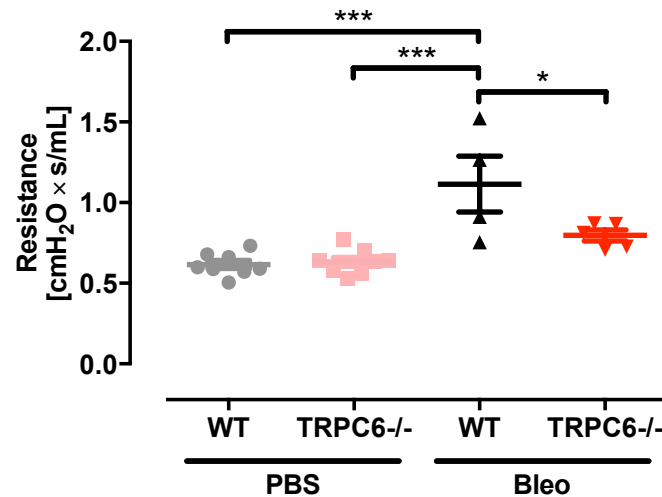


Abbildung 29: „Resistance“ (Atemwegswiderstand). Zusammenfassung der Werte für die „Resistance“ am Tag 14 nach Bleomycin/PBS-Applikation in Wildtyp (WT)- und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-})-Lungen. Statistische Tests wurden mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni's Post-hoc-Test“. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$; die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

In **Abbildung 30** ist der Volumenelastizitätskoeffizient E („**Elastance**“; ΔP (=Druck) / ΔV (=Volumen)) als Maß für die Lungendehnbarkeit der behandelten und unbehandelten WT- und TRPC6-defizienten Mäuse dargestellt. Auch hier zeigen WT-Mäuse einen signifikanten Anstieg der Lungendehnbarkeit nach Bleomycinapplikation im Vergleich zu den PBS-Kontroll-Mäusen. Die Werte für die TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-})-Mäuse nach Bleomycinapplikation waren allerdings sowohl signifikant erhöht zu den Werten der PBS-Kontrolltiere beider Genotypen als auch signifikant erniedrigt zu den Werten der Bleomycin-behandelten WT-Mäuse.

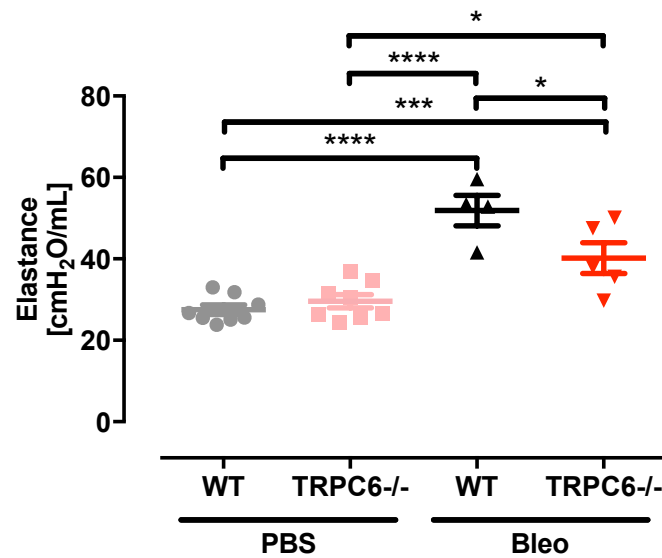


Abbildung 30: „Elastance“ (elastischer Lungenwiderstand). Zusammenfassung der Werte für die „Elastance“ am Tag 14 nach Bleomycin/PBS-Applikation in Wildtyp (WT)- und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-})-Lungen. Statistische Tests wurde mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni's Post-hoc-Test“ durchgeführt. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

In **Abbildung 31** ist nun noch der Kehrwert des Volumenelastizitätskoeffizienten E, die sog. „**Compliance**“ (ΔV (=Volumen) / ΔP (=Druck)) der behandelten und unbehandelten WT- und TRPC6-defizienten Mäuse am Tag 14 nach der Bleomycinapplikation dargestellt. Hier zeigten die WT- und die TRPC6-defizienten Mäuse nach intratrachealer Bleomycinapplikation einen signifikanten Abfall der Werte im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen. Obwohl hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der Bleomycin-behandelten WT- und TRPC6-defizienten Mäuse festgestellt werden konnte, waren die „Compliance“-Werte der WT-Mäuse deutlich niedriger als die der TRPC6-defizienten Mäuse.

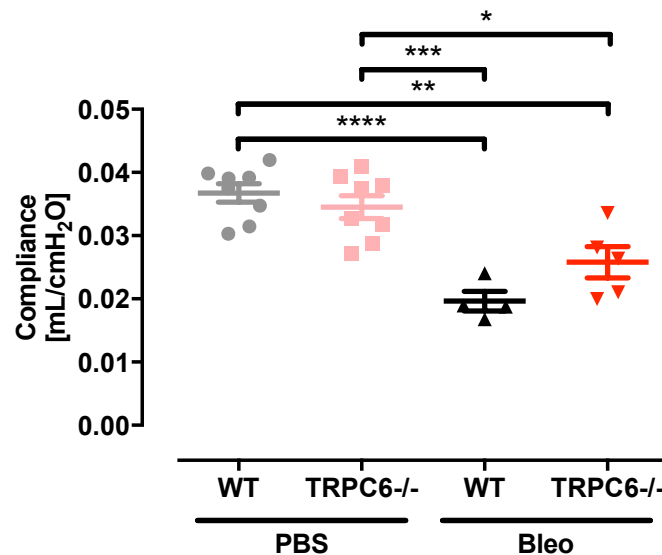


Abbildung 31: „Compliance“ (Lungendehnbarkeit). Zusammenfassung der Werte für die „Compliance“ am Tag 14 nach Bleomycin-Applikation in Wildtyp (WT)- und TRPC6-defizienten (TRPC6-/-)-Lungen. Statistische Tests wurden mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni's Post-hoc-Test“ durchgeführt. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.1.4 Immunohistologie der Lungengewebe

Die histologische Färbung wurde durchgeführt um die Verteilung der fibrotischen Plaques und den Schweregrad der fibrösen Veränderungen in den Bleomycin-behandelten Lungen im Vergleich zu den Kontrolllungen zu bestimmen.

Die **Abbildung 32** zeigt repräsentative histologische Lungenschnitte nach einer **Hämatoxylin&Eosin-Färbung** der rechten Lunge am Tag 14 nach der Applikation von Bleomycin oder PBS. Durch diese zweifach-Färbung werden Zellkerne blau und das Zytoplasma rosa/rot/orange gefärbt.

Die Bilder zeigen Bereiche der Lunge in die 14 Tage nach Bleomycinapplikation Zellen eingewandert sind (fibrotische Plaques markiert durch schwarze Pfeile). Diese fibrotischen Plaques und Verdickungen der alveolären Wand, die sowohl unter 20-facher (große Bilder) als auch unter zweifacher (kleine Bilder in der rechten unteren Ecke) erkennbar sind, finden sich nur in den Bleomycin-behandelten Mäusen aber nicht in den Kontrolltieren.

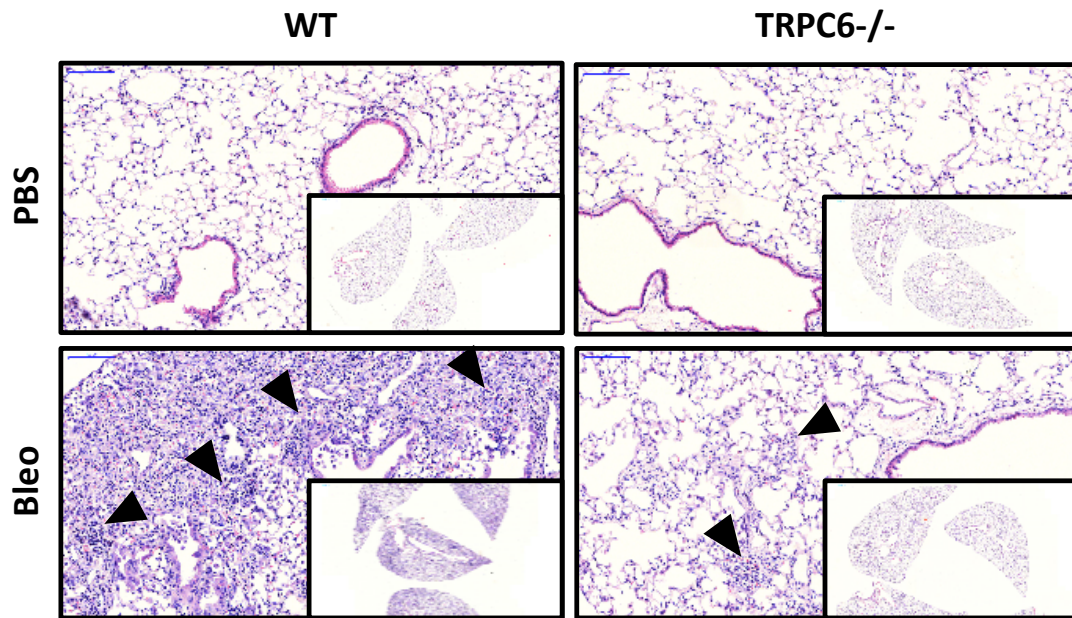


Abbildung 32: Repräsentative Bilder der H&E-Färbung von histologischen Lungenschnitten aus WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) Mäusen nach Behandlung mit Bleomycin (Bleo) oder PBS. Dunkelblau bis schwarz: Zellkerne; rosa: Kollagen; schwarze Pfeile: fibrotische Veränderungen. Kleine Übersichtsbilder in zweifacher Vergrößerung in der rechten unteren Ecke (der Größenmarker entspricht hier 10000 µm). Große Bilder zeigen Ausschnitte des 20-fach vergrößerten Lungengewebes (der Größenmarker entspricht hier 100 µm).

Abbildung 33 zeigt repräsentative histologische Lungenschnitte nach einer **Masson-Trichrom-Färbung** der rechten Lunge am Tag 14 nach der Applikation von Bleomycin oder PBS. Diese dreifach-Färbung färbt Erythrozyten, Zytoplasma und Muskelgewebe rot, Kollagen blaugrün und Zellkerne braun an.

Die Bilder zeigen Bereiche der Lunge welche nach 14 Tage nach Bleomycinapplikation von fibrösen Veränderungen (schwarze Pfeile) betroffen sind. In den Lungenschnitten der Bleomycin-behandelten TRPC6-defizienten Mäusen kommt es zu deutlich geringeren Kollagenablagerungen (türkis-blaue Färbung) verglichen mit den Bleomycin-behandelten WT-Mäusen. Die fibrotischen Veränderungen in den behandelten WT-Lungen sind deutlich zu sehen und in den TRPC6-defizienten Lungen reduziert. Auch die Verdickung der alveolären Wände ist in den behandelten WT-Mäusen deutlicher zu erkennen. Zusätzlich wandern Zellen (rote Punkte) sowohl in den WT- als auch in den TRPC6-defizienten Lungen ein, die charakteristisch für eine Entzündung des Gewebes sind. In den PBS-behandelten Lungen erkennt man keine fibrösen Veränderungen des Lungengewebes und auch einwandernde Zellen fehlen.

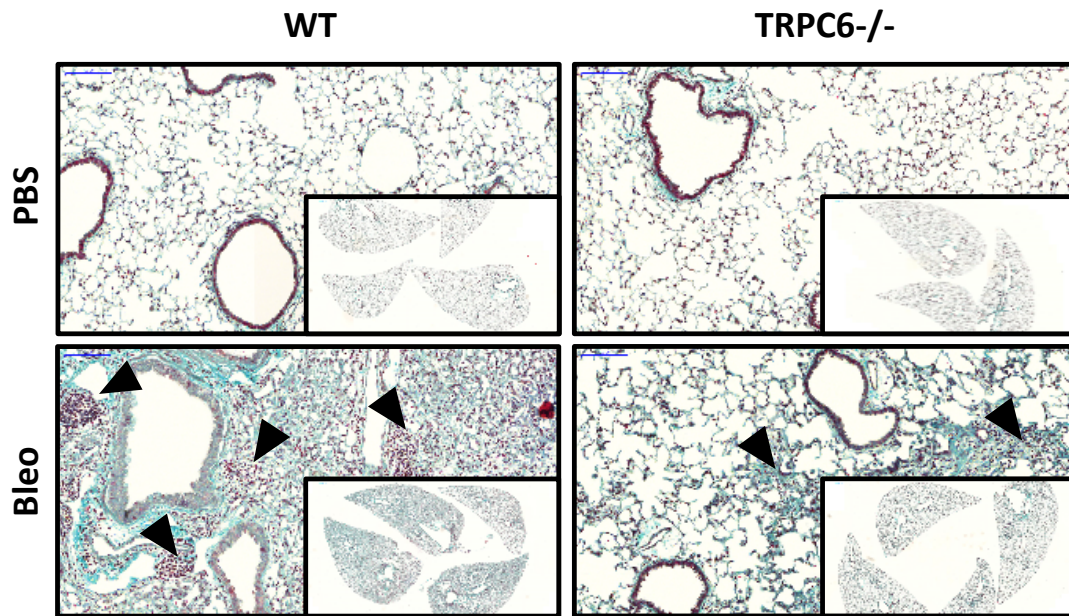


Abbildung 33: Repräsentative Bilder der Masson-Trichrom-Färbung von histologischen Lungenschnitten aus WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) Mäusen nach Behandlung mit Bleomycin (Bleo) oder PBS. Türkis-blau: Kollagen; rot-schwarz: Zellkerne; schwarze Pfeile: fibrotische Veränderung. Kleine Übersichtsbilder in zweifacher Vergrößerung in der rechten unteren Ecke (der Größenmarker entspricht hier 10000 μm). Große Bilder zeigen Ausschnitte des 20-fach vergrößerten Lungengewebes (der Größenmarker entspricht hier 100 μm).

3.1.5 Analyse der Genexpression in den Gesamtlungen nach Behandlung mit Bleomycin oder PBS

Um die erhöhte Expression von extrazellulärer Matrix und die fibrotischen Veränderungen nachzuweisen wurde die mRNA des Lungengewebes mit Hilfe der „reverse transcription“ (RT) quantitativen PCR (RT-qPCR) untersucht. So konnten die mRNA-Expressionslevel von Komponenten der extrazellulären Matrix und von Fibrosemarkern in WT- und TRPC6-defizienten Lungen verglichen werden.

Zunächst wurden Fibronektin (Fn1)- und Kollagen Typ 1 α 1 (Coll1 α 1)-mRNA als Proteine der extrazellulären Matrix nachgewiesen (Fernandez et al. 2012, Klingberg et al. 2013). Wie in **Abbildung 34** zu sehen ist werden sowohl Fn1 als auch Coll1 α 1 in geringen Mengen in den PBS-Kontrolllungen der Mäuse beider Genotypen exprimiert. In den mit Bleomycin-behandelten WT-Lungen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Expressionslevel der beiden Gene. Im TRPC6-defizienten Lungengewebe stieg jedoch nur die Expression für die Fn1-mRNA signifikant im Vergleich zur Kontrolle an. Für die Coll1 α 1-mRNA zeigte sich eine leichte Erhöhung

des mRNA-Gehaltes, der jedoch im Vergleich zu den Kontrollungen nicht signifikant war. In den Bleomycin-behandelten TRPC6-defizienten Lungen konnte eine signifikant geringere Expression an Coll1 α 1-mRNA als in den Bleomycin-behandelten WT-Lungen nachgewiesen werden. Die Expression von Fn1-mRNA war zwar in den Bleomycin-behandelten TRPC6-defizienten Lungen geringer, zwischen beiden behandelten Genotypen zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied.

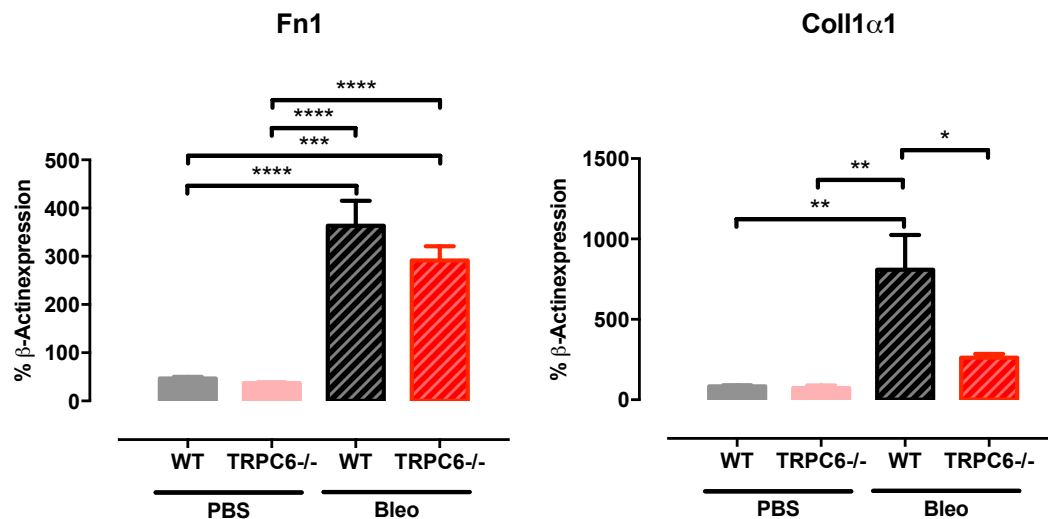


Abbildung 34: Genexpression der extrazellulären Matrixproteine Fibronektin und Kollagen-Typ1 α 1 in der Gesamtlunge der Mäuse am Tag 14 nach der Bleomycin-Applikation. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das Haushaltsgen β -Aktin im Lungengewebe von Kontroll (PBS) und Bleomycin-behandelten WT- und TRPC6-defizienten Mäusen. Fn1: Fibronektin1; Coll1 α 1: Kollagen Typ1 α 1; WT PBS n=5; WT TRPC6^{-/-} n=6; WT Bleo n=7; TRPC6^{-/-} n=8; Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni's Post-hoc-Test“. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

Anschließend wurden die mRNAs für α -glattes Muskelaktin (α SMA) und den Serinprotease-Inhibitor Serpin Typ1 (PAI-1/Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1) analysiert (siehe **Abbildung 35**). Beide Gene werden durch das profibrotische Zytokin TGF- β ₁ reguliert und dienen als Fibrosemarker (Fernandez et al. 2012, Ghosh et al. 2012). Die Expressionslevel beider Gene unterschieden sich in den Lungengewebe der Kontrollen beider Genotypen nicht. Durch die Behandlung mit Bleomycin kam es in den WT-Lungen zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Level verglichen mit den Kontrollen. Dieser Anstieg des mRNA-Gehaltes fehlte jedoch in den Bleomycin-behandelten TRPC6-defizienten Lungen.

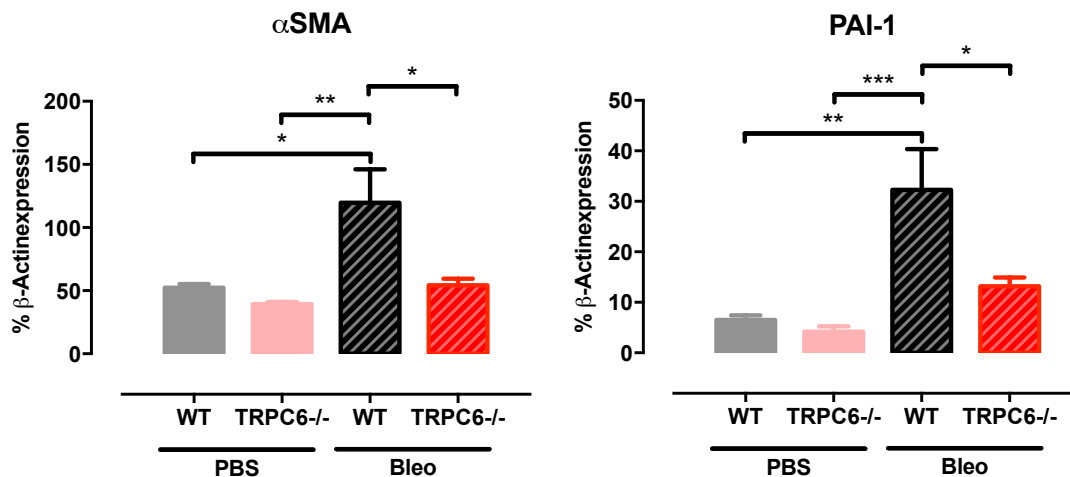


Abbildung 35: Genexpression der Fibrosemarker α -glattes Muskelaktin und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1 in der Gesamtlunge der Mäuse am Tag 14 nach der Bleomycinapplikation. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das Haushaltsgen β -Aktin im Lungengewebe von Kontroll (PBS) und Bleomycin-behandelten WT- und TRPC6-/-Mäusen. α SMA: α -glattes Muskelaktin; PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1; WT PBS n=5; WT TRPC6-/- n=6; WT Bleo n=7; TRPC6-/- n=8; Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni's Post-hoc-Test“. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.1.6 Kollagenexpression in den Lungen von Bleomycin/PBS-behandelten WT- und TRPC6-defizienten Mäusen

Um eine erhöhte Kollagen-Produktion während der Entwicklung einer Fibrose in der Lunge quantitativ nachzuweisen wurde ein Hauptbestandteil des Kollagens, das Hydroxyprolin (HYP), aus dem Lungengewebe quantitativ nachgewiesen. Das über eine saure Hydrolyse aus dem pulverisierten Lungengewebe isolierte HYP konnte mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) identifiziert und quantifiziert werden. Wie in **Abbildung 36** zu sehen ist, war der HYP-Gehalt in den Bleomycin-behandelten WT-Mäusen verglichen zu den Kontrollen signifikant erhöht. Die Lungen der Bleomycin-behandelten TRPC6-defizienten Mäuse zeigten keinen signifikanten Anstieg der HYP-Produktion im Vergleich mit den PBS-behandelten Kontrolltieren.

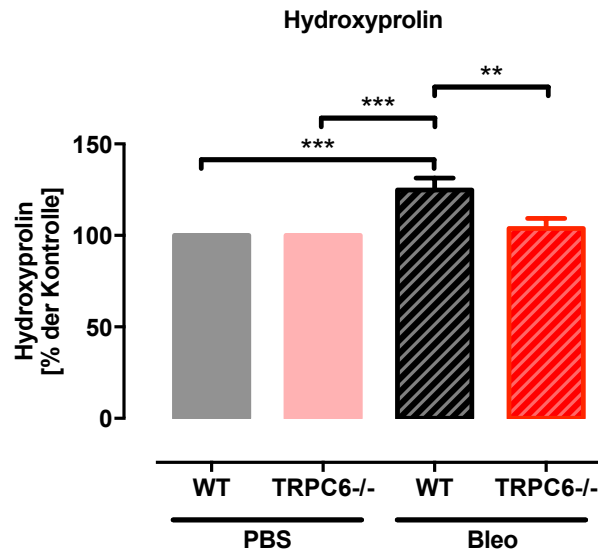


Abbildung 36: Quantifizierung des Hydroxyprolinegehaltes im Lungengewebe der Mäuse am Tag 14 nach der Bleomycin-Applikation. Dargestellt ist die Hydroxyprolin-Expression in % bezogen auf die Werte der Kontrolllungen. Untersucht wurde das Lungengewebe von Kontroll (PBS) und Bleomycin-behandelten WT- und TRPC6-defizienten Mäusen. WT PBS n=9; WT TRPC6-/- n=8; WT Bleo n=6; TRPC6-/- n=7; Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni's Post-hoc-Test“. ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2 Funktionelle Analyse des TRPC6-Kanals in isolierten murinen primären Lungenfibroblasten während der Myofibroblasten-Differenzierung

In vivo konnte gezeigt werden, dass der TRPC6-Kanal eine wichtige Rolle während der Ausbildung einer experimentellen Lungenfibrose in Mäusen zu spielen scheint. Verantwortlich für die Produktion von Kollagen und anderen Proteinen der extrazellulären Matrix sind hauptsächlich aus Lungenfibroblasten transformierte Myofibroblasten (siehe in Abschnitt 1.1.4). Aus diesem Grund sollte nun die TRPC6-Funktion und der involvierte Signaltransduktionsweg auf molekularer Ebene in Lungenfibroblasten und in durch TGF- β_1 -differenzierten Myofibroblasten näher untersucht werden. Hierzu wurden aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen sogenannte primäre murine Lungenfibroblasten isoliert (pmLF), die Myofibroblastentransformation durch TGF- β_1 induziert und die Zellen auf ihre Gen- und Proteinexpression sowie Kontraktionsfähigkeit und Barrierefunktion untersucht.

3.2.1 Identifizierung von primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF)

Um die Reinheit und Identität der primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) nach der Isolation zu überprüfen wurden RT-qPCRs und Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Hierfür wurden pmLF aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben isoliert und die Gen- und Proteinexpression von α -glattes Muskelaktin (α -SMA), Fibronectin1 (Fn1) und Kollagen Typ1 α 1 (Coll1 α 1) nachgewiesen. α -SMA ist auch ein Marker für aktivierte Fibroblasten, wird jedoch in naiven Fibroblasten ebenfalls im geringen Maße neben Fibronectin1 (Fn1) und Kollagen Typ1 α 1 (Coll1 α 1) exprimiert (Eyden 2008, Klingberg et al. 2013).

3.2.1.1 Genexpression in WT- und TRPC6-defizienten pmLFs

Zunächst wurde die Genexpression von mesenchymalen Markerproteinen in der RT-qPCR nachgewiesen. Wie in **Abbildung 37** zu sehen ist, wurde sowohl α -glattes Muskelaktin (α SMA)-, als auch Fibronectin (Fn1) und Kollagen Typ1 α 1 (Coll1 α 1)-mRNA in pmLF beider Genotypen in gleicher Menge exprimiert.

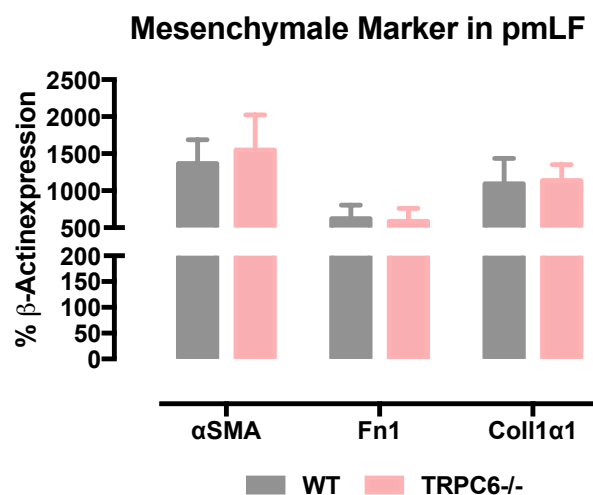


Abbildung 37: Nachweis von α -glatten Muskelaktin-, Fibronectin1- und Kollagen Typ1 α 1-mRNA durch quantitative RT-qPCR in primären Lungenfibroblasten isoliert aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen. Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf das Haushaltsgen β -Aktin. Untersucht wurden primären Lungenfibroblasten (pmLF) isoliert aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen. WT, TRPC6^{-/-} n=5; α SMA: α -glattes Muskelaktin; Fn1: Fibronectin1; Coll1 α 1: Kollagen Typ1 α 1; Statistische Analyse mittels „Two-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni's Post-hoc-Test“. Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.1.2 Immunfluoreszenzfärbung von WT- und TRPC6-defizienten pmLFs

Anschließend wurde auch die Proteinexpression überprüft indem die WT- und TRPC6-defizienten pmLF mittels spezifischer Antikörper gegen die jeweiligen Markerproteine angefärbt wurden. Als Positivkontrolle dienten immortalisierte murine embryonale Fibroblasten (MEF) und als Negativkontrolle primäre Podozyten (primär isoliert von Dr. Jana Demleitner/AG Dietrich; Li et al. 2008). Es gibt keine spezifischen Zellmarkerproteine nur für Fibroblasten, sondern nur mehrere Proteine, die für Fibroblasten charakteristisch sind (Baum et al. 2011, Phan 2008).

α SMA

Mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen α -glattes-Muskelaktin (α SMA) und der Verwendung eines entsprechenden fluoreszenzgekoppelten FITC-Zweitantikörpers (vergleiche Abschnitt 2.1.9 und Abschnitt 2.1.10) konnte α SMA in den primär isolierten Lungenfibroblasten (pmLF) über Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 38**). Es zeigten sich bei beiden Genotypen stärker und schwächer gefärbte Zellen, wobei die stärker gefärbten Zellen wahrscheinlich mitisolierte Myofibroblasten sind (Verunreinigung). Auch die als Positivkontrolle dienenden murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)-Zellen zeigten ein eindeutiges Signal mit den spezifischen Antikörpern. Als Negativkontrolle fungierten Podozyten, bei denen kein α SMA-spezifisches Fluoreszenzsignal sichtbar war. Zellkerne wurden in allen Bildern durch eine Höchst-Färbung identifiziert.

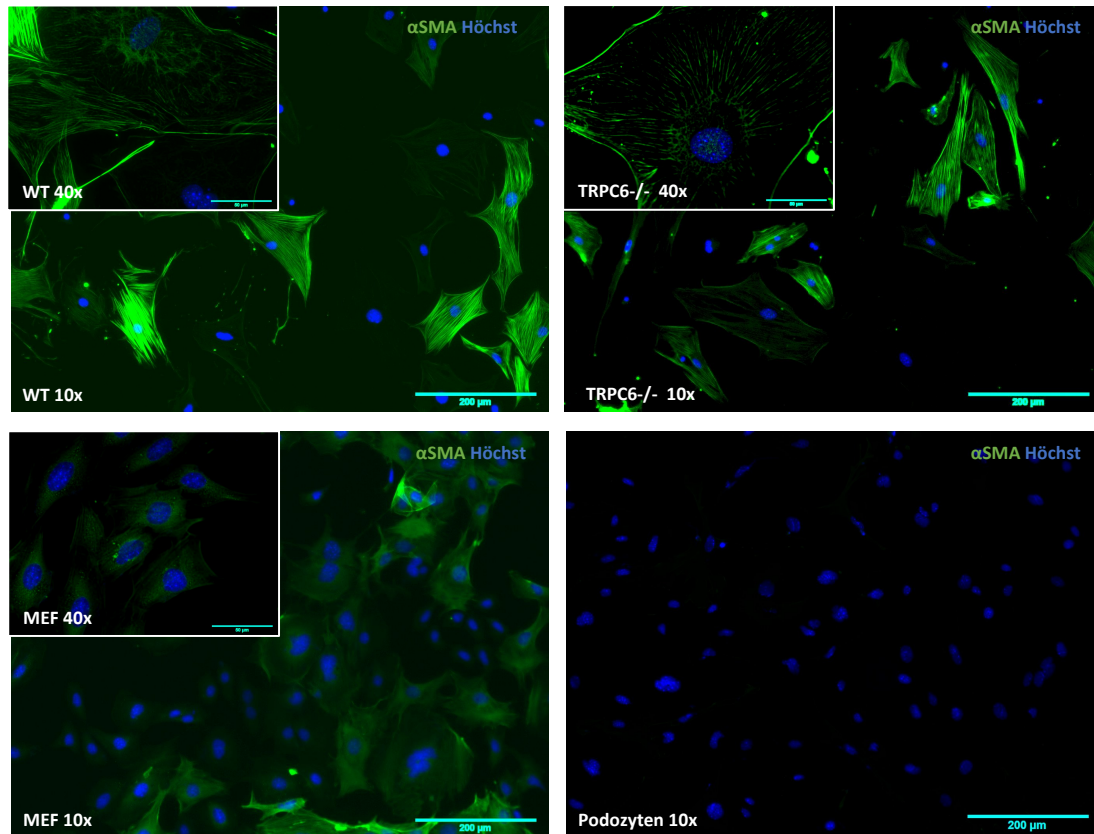


Abbildung 38: Nachweis von α -glatten Muskelaktin (α SMA) in primären murinen Lungenfibroblasten. Die WT- und TRPC6-defizienten pmLFs sowie die murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) zeigen im Gegensatz zu den Podozyten eine deutliche Anfärbung (grün) mit dem Fluoreszenz-gekoppelten α SMA-Antikörper (α SMA). Zellkerne wurden mit dem Höchst-Farbstoff (Höchst) blau markiert. pmLF = primären murinen Lungenfibroblasten; WT = Wildtyp pmLF; TRPC6-/- = TRPC6-defiziente pmLF; MEF = Positivkontrolle (murine embryonale Fibroblasten); Podozyten = Negativkontrolle; Kleine Übersichtsbilder in 40-facher Vergrößerung (40x) sind in der linken oberen Ecke lokalisiert (Größenmarker: 50 μ m). Große Bilder zeigen Ausschnitte der 10-fach (10x) vergrößerten Zellen (Größenmarker: 200 μ m).

Eine zusätzliche Färbung der WT-pmLF mit dem Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC)-gekoppelten Phalloidin (**Abbildung 39**) zeigt filamentöses Aktin (F-Aktin), also das Zytoskeletts, in rot. Mit dem Fluoreszenz-gekoppelten α SMA-Antikörper (grün) gibt es in einigen Zellen eine Überlagerung (gelbe Falschfarbe).

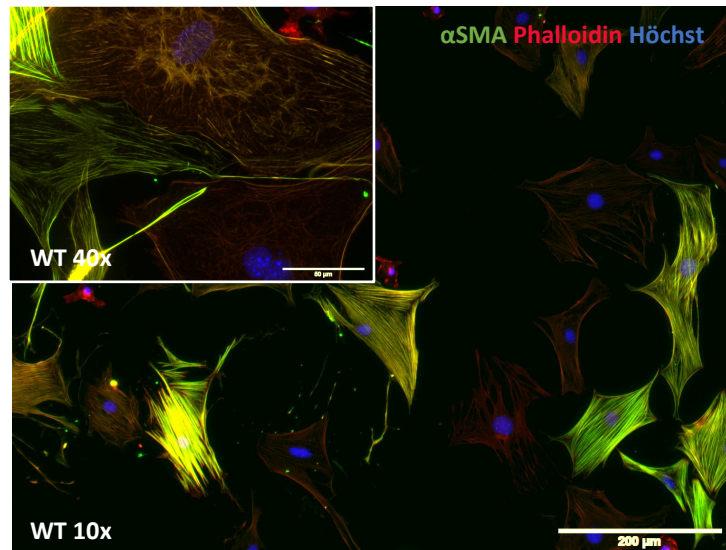


Abbildung 39: Nachweis von α -glattem Muskelaktin (α SMA) und dem Zytoskelett in primären murinen Wildtyp-Lungefibroblasten. Die WT-pmLFs zeigen eine deutliche Anfärbung mit dem Fluoreszenz-gekoppelten α SMA-Antikörper (α SMA; grün) und des Zytoskelettes (Phalloidin; rot). Zellkerne wurden mit dem Höchst-Farbstoff (Höchst) blau markiert. pmLF = primären murinen Lungenfibroblasten; WT = Wildtyp pmLF; Kleine Übersichtsbilder in 40-facher Vergrößerung (40x) sind in der linken oberen Ecke lokalisiert (Größenmarker: 50µm). Große Bilder zeigen Ausschnitte der 10-fach (10x) vergrößerten Zellen (Größenmarker: 200 µm).

Fn1

Mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Fibronectin1 (Fn1) und der Verwendung eines entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Alexa488-Zweitantikörpers konnte Fn1 sowohl in den WT- als auch in den TRPC6-defizienten primär isolierten Lungenfibroblasten (pmLF) über Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 40**). Auch die Positivkontrolle (MEF-Zellen) zeigte ein eindeutiges Signal mit den spezifischen Antikörpern, während bei der Negativkontrolle (Podozyten) kein Signal für Fn1 unter Verwendung des spezifischen Antikörpers entdeckt werden konnte. Hier wurde lediglich der Zellkern durch Höchst sichtbar. Zellkerne wurden in allen Bildern durch eine Höchst-Färbung identifiziert.

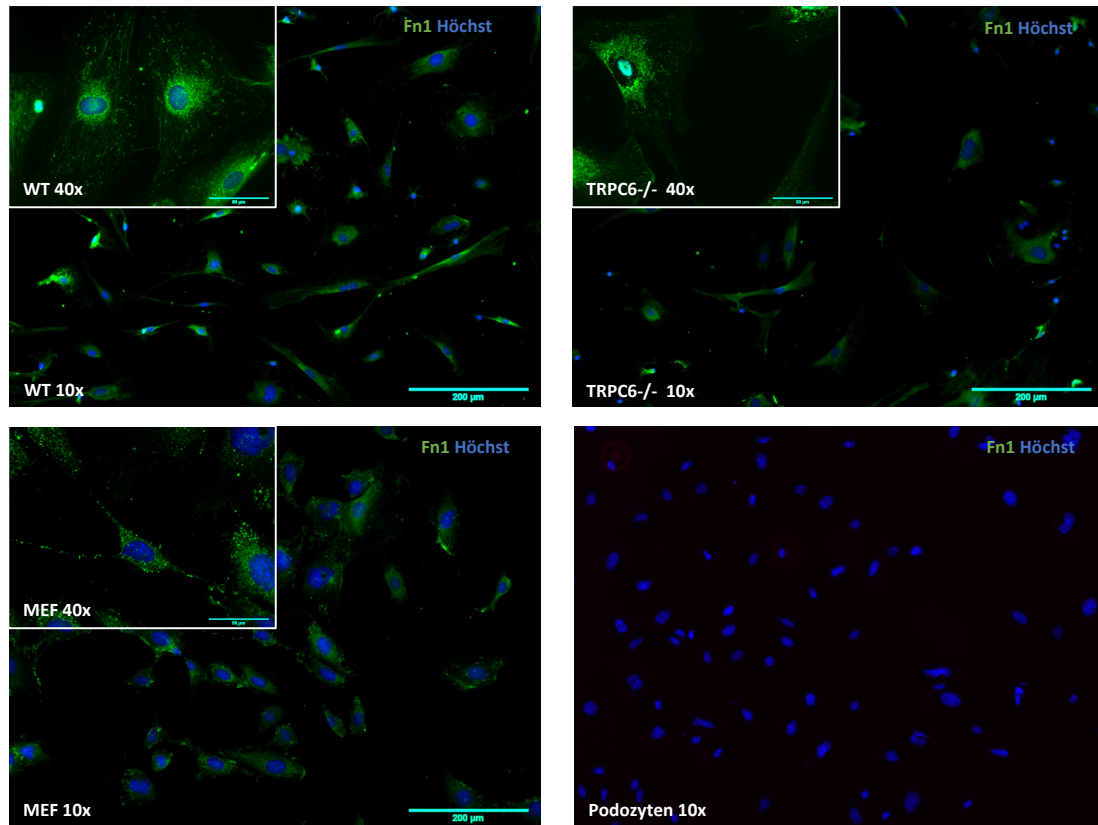


Abbildung 40: Nachweis von Fibronektin1 (Fn1) in primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF). Die WT- und TRPC6-defizienten pmLFs sowie die murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) zeigen im Gegensatz zu den Podozyten eine deutliche Anfärbung (grün) mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Fn1-Antikörper (Fn1). Zellkerne wurden mit dem Höchst-Farbstoff (Höchst) blau markiert. WT = Wildtyp pmLF; TRPC6^{-/-} = TRPC6-defiziente pmLF; MEF = Positivkontrolle (murine embryonale Fibroblasten); Podozyten = Negativkontrolle; Kleine Übersichtsbilder in 40-facher Vergrößerung (40x) sind in der linken oberen Ecke lokalisiert (Größenmarker: 50 µm). Große Bilder zeigen Ausschnitte der 10-fach (10x) vergrößerten Zellen (Größenmarker: 200 µm).

Auch hier wurde eine zusätzliche Färbung mit dem TRITC-gekoppelten Phalloidin durchgeführt (siehe **Abbildung 41**). In rot zu erkennen ist das durch das Pilzgift Phalloidin angefärbte Zytoskelett der pmLF. Eindeutig davon abzugrenzen ist das durch den spezifischen Fn1-Antikörper angefärbte Fibronektin1, welches vor allem in der Nähe des Nukleus angefärbt wird.

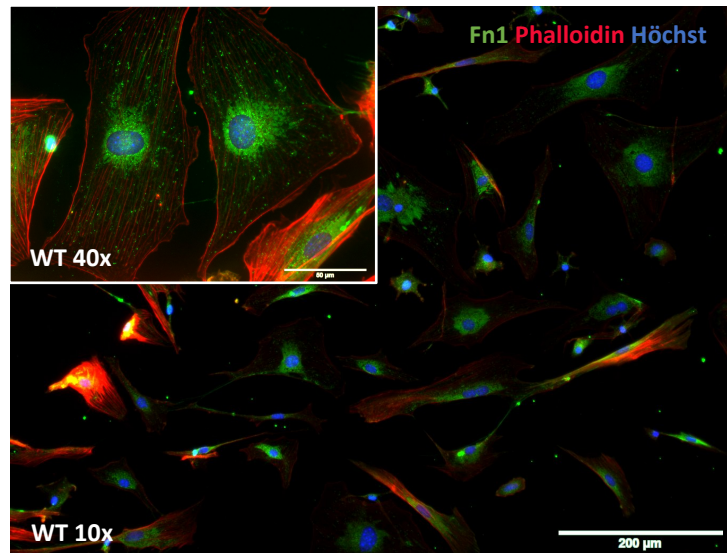


Abbildung 41: Nachweis von Fibronektin1 (Fn1) und dem Zytoskelett in primären murinen Wildtyp-Lungenfibroblasten. Die WT-pmLFs zeigen eine deutliche Anfärbung mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Fn1-Antikörper (Fn1; grün) und des Zytoskelettes (Phalloidin; rot). Zellkerne wurden mit dem Höchst-Farbstoff (Höchst) blau markiert. pmLF = primären murinen Lungenfibroblasten; WT = Wildtyp pmLF; Kleine Übersichtsbilder in 40-facher Vergrößerung (40x) sind in der linken oberen Ecke lokalisiert (Größenmarker: 50 µm). Große Bilder zeigen Ausschnitte der 10-fach (10x) vergrößerten Zellen (Größenmarker: 200 µm).

Coll1α1

Das Kollagen Typ1α1 (Coll1α1) konnte mithilfe des spezifischen Antikörpers und unter der Verwendung eines entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Alexa488-Zweitantikörpers sowohl in den WT- als auch in den TRPC6-defizienten primär isolierten Lungenfibroblasten (pmLF) über die Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 42**). Der Zellkern wurde mit Höchst gegengefärbt. Auch die Positivkontrolle (MEF-Zellen) zeigte ein eindeutiges Signal mit den spezifischen Antikörpern, während in der Negativkontrolle (Podozyten) nur der Zellkern durch Höchst sichtbar wurde.

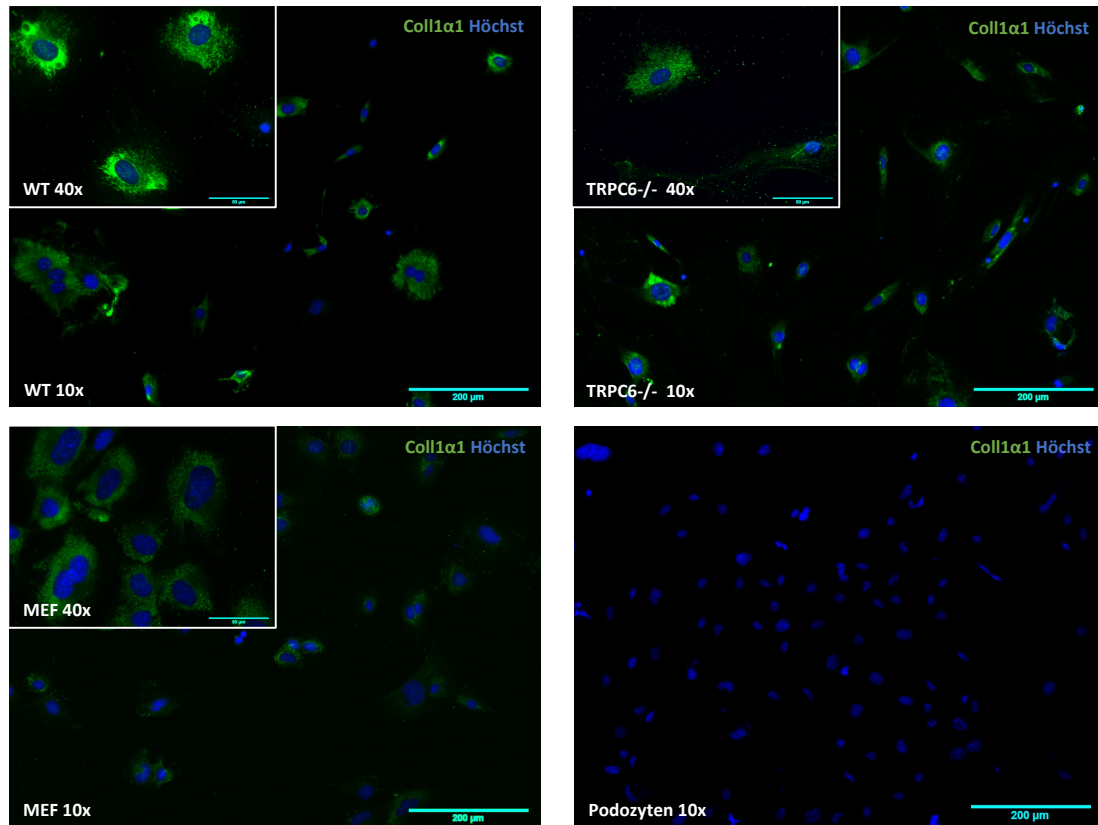


Abbildung 42: Nachweis von Kollagen Typ1 α 1 (Coll1 α 1) in primären murinen Lungenfibroblasten. Die WT- und TRPC6-defizienten pmLFs sowie die murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) zeigen im Gegensatz zu den Podozyten eine deutliche Anfärbung (grün) mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Coll1 α 1-Antikörper (Coll1 α 1). Zellkerne wurden mit dem Höchst-Farbstoff (Höchst) blau markiert. pmLF = primären murinen Lungenfibroblasten; WT = Wildtyp pmLF; TRPC6 $^{-/-}$ = TRPC6-defiziente pmLF; MEF = Positivkontrolle (murine embryonale Fibroblasten); Podozyten = Negativkontrolle; Kleine Übersichtsbilder in 40-facher Vergrößerung (40x) sind in der linken oberen Ecke lokalisiert (Größenmarker: 50 μ m). Große Bilder zeigen Ausschnitte der 10-fach (10x) vergrößerten Zellen (Größenmarker: 200 μ m).

Die zusätzliche Färbung mit dem TRITC-gekoppelten Phalloidin macht auch hier die Lokalisation des Kollagens vom Typ1 α 1 erkenntlich (siehe **Abbildung 43**). Das Zytoskelett ist hier ebenso durch die leicht rote Anfärbung sichtbar und das Kollagen befindet sich ähnlich dem Fn1 in Nähe des Zellkerns.

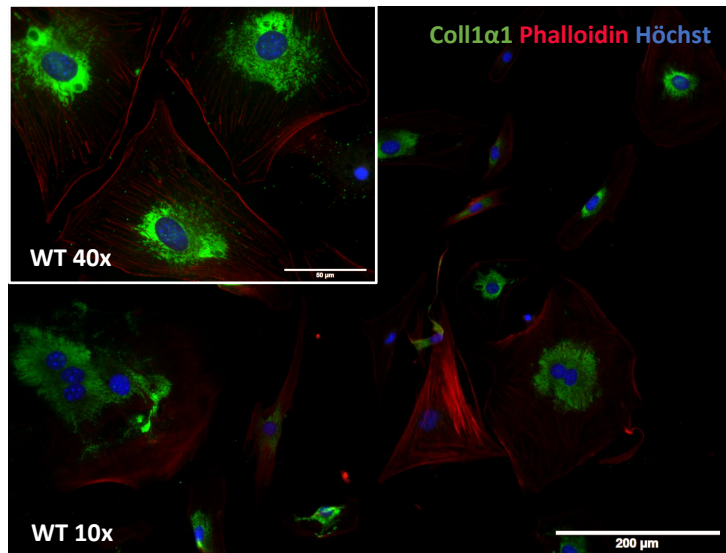


Abbildung 43: Nachweis von Kollagen $Typ1\alpha1$ ($Coll1\alpha1$) und dem Zytoskelett in primären murinen Wildtyp-Lungenfibroblasten. Die WT-pmLFs zeigen eine deutliche Anfärbung mit dem Fluoreszenzgekoppelten $Coll1\alpha1$ -Antikörper ($Coll1\alpha1$; grün) und des Zytoskelettes (Phalloidin; rot). Zellkerne wurden mit dem Höchst-Farbstoff (Höchst) blau markiert. pmLF = primären murinen Lungenfibroblasten; WT = Wildtyp pmLF; Kleine Übersichtsbilder in 40-facher Vergrößerung (40x) sind in der linken oberen Ecke lokalisiert (Größenmarker: 50 μm). Große Bilder zeigen Ausschnitte der 10-fach (10x) vergrößerten Zellen (Größenmarker: 200 μm).

3.2.2 Funktionelle Charakterisierung der primären WT- und TRPC6-defizienten Lungenfibroblasten

3.2.2.1 Morphologie der WT- und TRPC6-defizienten pmLF

Im Phasenkontrastbild konnte zwischen den beiden Genotypen kein offensichtlicher Unterschied detektiert werden (vergleiche **Abbildung 44**). Sowohl die WT- als auch die TRPC6-defizienten pmLF zeigen viele Zellfortsätze, besitzen einen ovalen, helleren Zellkern mit deutlich erkennbaren Nukleoli (Eyden 2008).

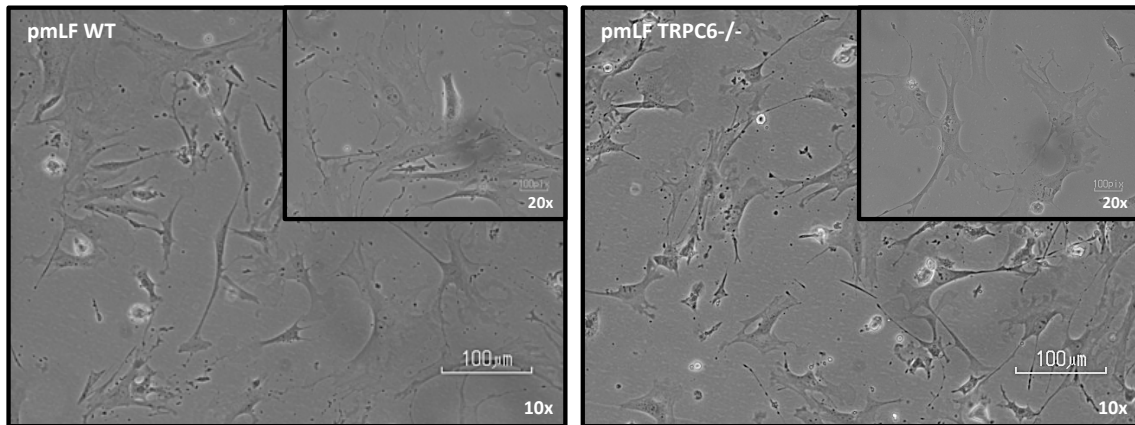


Abbildung 44: Phasenkontrastbilder von primären murinen Lungenfibroblasten isoliert aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen. Die Zellen beider Genotypen zeigen ungleichmäßige Zellfortsätze und einen deutlich erkennbaren Nukleus (hell und oval mit sichtbarem Nukleolus). Kleine Übersichtsbilder in 20-facher Vergrößerung (20x) sind in der rechten oberen Ecke lokalisiert (Größenmarker: 100 µm). Große Bilder zeigen Ausschnitte der 10-fach (10x) vergrößerten Zellen (Größenmarker: 100 µm).

3.2.2.2 Genexpressionsmuster der TRPC-Kanäle in WT- und TRPC6-defizienten pmLF

Mithilfe der RT-qPCR konnten die Expressionslevel der sieben TRPC-Kanäle (TRPC1-7) in den pmLF auf mRNA-Ebene bestimmt werden. In **Abbildung 45** sind die relativen Genexpressionslevel für die pmLF isoliert aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen für TRPC1-7 relativ zum Haushaltsgen β -Aktin dargestellt.

Deutlich zu erkennen ist eine hohe Expression von TRPC1-mRNA sowohl in den WT- als auch in den TRPC6-defizienten pmLF. TRPC6-mRNA wird in WT-pmLF nur in geringem Maße exprimiert und ist in den gendefizienten pmLF kaum detektierbar. Die übrigen TRPC-Kanäle, also TRPC2-5 und TRPC7 sind in den Lungenfibroblasten aus beiden Genotypen kaum bis gar nicht detektierbar.

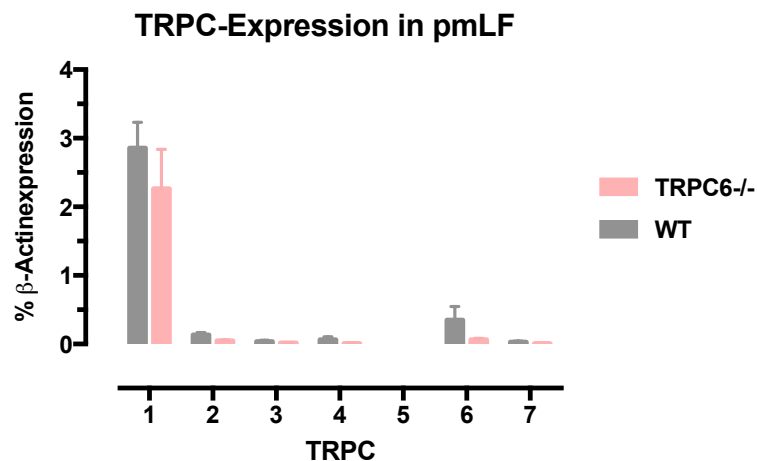


Abbildung 45: Nachweis von TRPC (TRPC1-7)-mRNA durch quantitative RT-PCR in primären murinen Lungenfibroblasten aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen. Dargestellt ist die relative Genexpression in % bezogen auf die mRNA des Haushaltsgenes (β -Aktin). Alle mRNAs der TRPC-Kanäle mit Ausnahme der TRPC6-mRNA werden in gleichem Maße in WT- und TRPC6-defizienten pmLF exprimiert. pmLF = primären murinen Lungenfibroblasten; WT n = 5; TRPC6-/- n=4; n= Anzahl der untersuchten Lungenfibroblastenklone. Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni's Post-hoc-Test“. Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.3 TRPC6-Funktion in pmLF während der TGF- β_1 -induzierten Myofibroblasten-Transformation

3.2.3.1 Nachweis der TGF- β_1 -induzierten Myofibroblasten-Transformation mittels der quantitativen RT-PCR von mRNAs der Zielgene

Das α -glatte Muskelaktin (α SMA) (Fernandez et al. 2012) und der Serinprotease-Inhibitor Serpin Typ1 (PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1) (Ghosh et al. 2012) sind zwei Markerproteine, deren Expression durch die Applikation von TGF- β_1 während der Myofibroblastendifferenzierung aktiviert wird. Aus diesem Grund wurde die Genexpression dieser zwei Zielgene mittels qRT-PCR analysiert. Durch die Behandlung mit TGF- β_1 kam es in den WT-Lungen zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Level beider Gene verglichen mit den Kontrollen (siehe **Abbildung 46**). Dieser Anstieg des mRNA-Gehaltes zeigte sich für die TGF- β_1 -behandelten TRPC6-defizienten pmLF jedoch nicht. Hier waren die Expressionslevel signifikant niedriger reguliert im Vergleich zu den WT-pmLF nach der TGF- β_1 -Applikation.

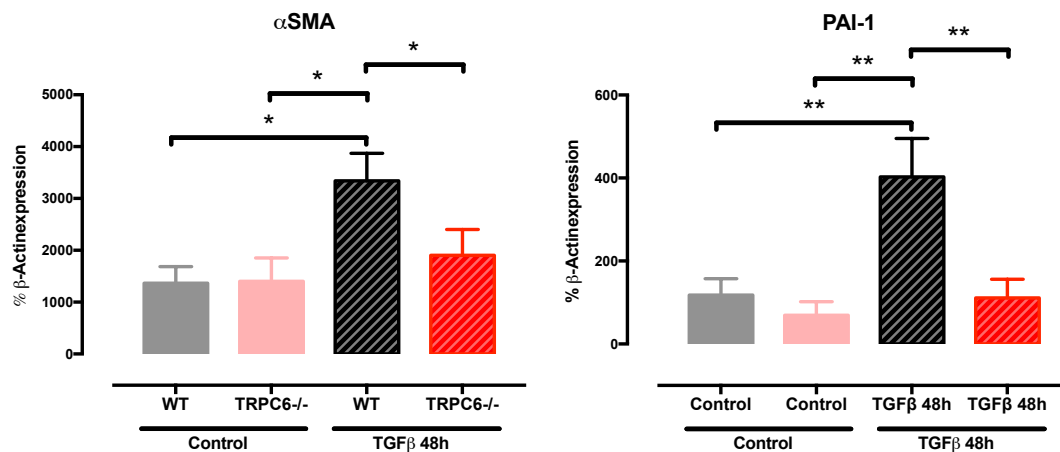


Abbildung 46: Nachweis der Genexpression der Differenzierungsmarker α SMA und PAI-1 durch quantitative RT-PCR von mRNA aus pmLF, die mit TGF- β_1 („TGF β 48h“) oder Lösungsmittel („Control“) inkubiert wurden. Dargestellt ist die relative α SMA- und PAI-1-mRNA Expression in behandelten und unbehandelten WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) pmLF bezogen auf das Haushaltsgen β -Aktin. α SMA: α -glattes Muskelaktin; PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ1; $n = 5$, n = Anzahl der untersuchten Lungenfibroblastenklone; Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem Newman-Keuls Post-hoc-Test“. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.3.2 Analyse der TRPC6-Expression in pmLF nach Applikation von TGF- β_1

Abschließend wurden die mRNA-Level des TRPC6-Gens in den TGF- β_1 -behandelten und unbehandelten pmLF aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen analysiert. Durch die Behandlung mit TGF- β_1 wurde die Expression von TRPC6-mRNA in den WT-Lungen signifikant erhöht (3-fach höhere Expression), während es bei dem TRPC6-defizienten pmLF zu keiner Änderung kam (siehe **Abbildung 47**).

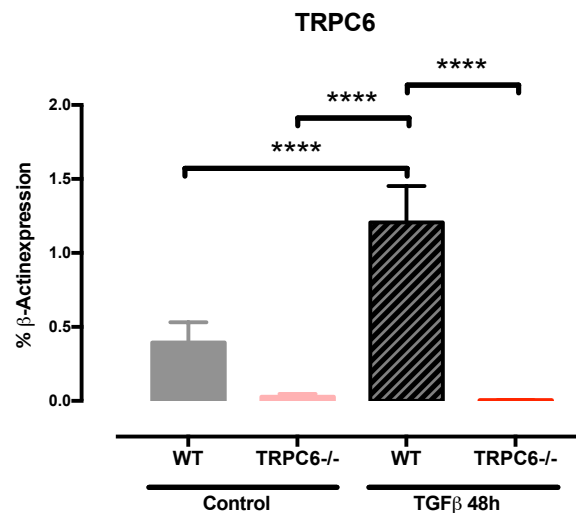


Abbildung 47: Nachweis der Genexpression des TRPC6-Kanals durch quantitative RT-PCR von mRNA in pmLF, die mit TGF- β_1 („TGF β 48h“) oder Lösungsmittel („Control“) inkubiert wurden. Dargestellt ist die relative TRPC6-mRNA Expression in behandelten und unbehandelten WT- und TRPC6-defizienten pmLF bezogen auf das Haushaltsgen β -Aktin. $n = 5$ untersuchte Lungenfibroblastenklone; Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Newman-Keuls Post-hoc-Test“. **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.3.3 Nachweis von Proteinmarkern für die TGF- β_1 -induzierte Myofibroblasten-Transformation mittels Western Blot

α SMA

Mithilfe des Western Blots konnte durch den Einsatz eines spezifischen Antikörpers das α SMA mit einem Molekulargewicht von 43 kDa in pmLF nachgewiesen werden. Dargestellt in **Abbildung 48 A** ist ein repräsentativer Western Blot mit Lysaten aus sowohl TGF- β_1 -behandelten als auch unbehandelten WT- und TRPC6-defizienten pmLF. Als Ladekontrolle wurde Vinculin mit einem Molekulargewicht von 110 kDa durch ein spezifisches Antiserum detektiert. In **Abbildung 48 A** ist ein Anstieg der α SMA-Proteinkonzentration nach Exposition mit TGF- β_1 zu erkennen, der in den mit Lösungsmittel-behandelten WT-pmLF (Kontrolle) fehlt. Für die TRPC6-defizienten pmLF zeigt sich ein geringerer Anstieg an α SMA-Protein nach Behandlung mit TGF- β_1 im Vergleich zur Kontrolle. Der Western Blot wurde mehrmals mit unterschiedlichen pmLF-Klonen wiederholt und die quantitative Auswertung der α SMA-Expression ist in **Abbildung 48 B** dargestellt. Die Proteinexpression von α SMA wurde auf die jeweilige Ladekontrolle bezogen und ist als relative

Quantifizierung angegeben. Die Behandlung mit TGF- β_1 führte in den WT-pmLF zu einer signifikant erhöhten Expression an α SMA im Vergleich mit den Lösungsmittel-behandelten pmLF beider Genotypen. Ein Anstieg der α SMA-Proteinkonzentration nach Exposition der TRPC6-defizienten pmLF mit TGF- β_1 war zwar zu erkennen, war aber im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant.

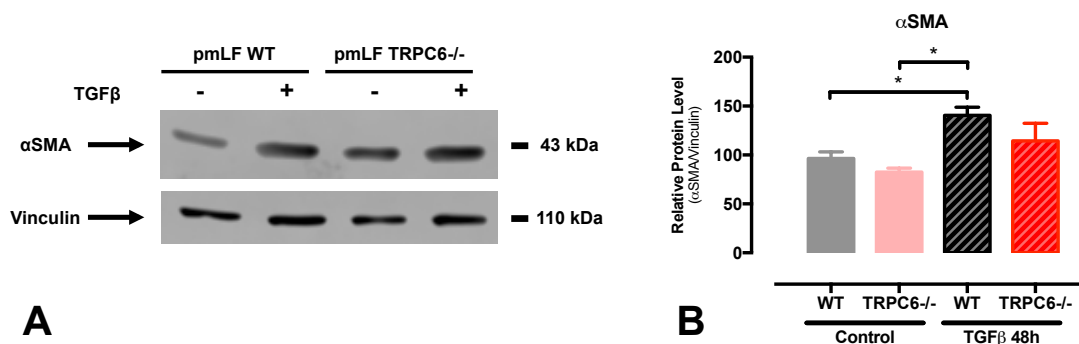


Abbildung 48: Nachweis von α SMA-Protein in TGF- β_1 („TGF β 48h“)- und mit Lösungsmittel („Control“)-behandelten pmLF im Western Blot. A) Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus pmLF-Lysaten. Die Lysate wurden hergestellt aus unbehandelten (-) und TGF- β_1 -behandelten (+) pmLF aus WT- oder TRPC6-defizienten (TRPC6 $^{-/-}$) Mäusen. Das Molekulargewicht von α SMA liegt bei 43 kDa und das der Ladekontrolle Vinculin bei 110 kDa. B) Quantifizierung der α SMA-Expression in WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6 $^{-/-}$) pmLF. Dargestellt ist die relative α SMA-Proteinexpression in TGF- β_1 -behandelten und mit Lösungsmittel-behandelten pmLF bezogen auf die Ladekontrolle Vinculin. $n = 4$ untersuchte Lungenfibroblastenklone; Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Newman-Keuls Post-hoc-Test“. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. α SMA: α -glattes Muskelaktin.

TRPC6

Auch die Proteinexpression des TRPC6-Kanals mit einem Molekulargewicht von 130 kDa konnte mittels Western Blot analysiert werden. Als Ladekontrolle diente β -Aktin mit einem Molekulargewicht von 43 kDa. In **Abbildung 49** ist ein repräsentativer Western Blot mit Lysaten aus TGF- β_1 -behandelten und mit Lösungsmittel-behandelten WT- und TRPC6-defizienten pmLF dargestellt. Das TRPC6-Protein wurde weder in den mit Lösungsmittel-behandelten WT-pmLF noch in den TRPC6-defizienten pmLF nachgewiesen. Bei den WT-pmLF konnte aber im Gegensatz zu den TRPC6-defizienten pmLF nach TGF- β_1 -Behandlung das TRPC6-Protein detektiert werden.

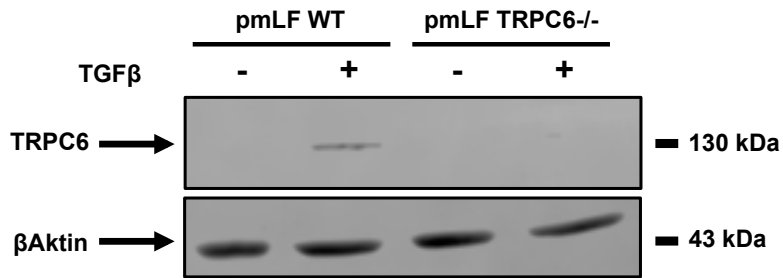


Abbildung 49: Nachweis von TRPC6-Protein in TGF- β_1 (TGF β)- und mit Lösungsmittel („Control“)-behandelten pmLF im Western Blot. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus pmLF-Lysaten. Die Lysate wurden hergestellt aus unbehandelten (-) und TGF- β_1 -behandelten (+) pmLF aus WT- oder TRPC6-defizienten (TRPC6-/-) Mäusen. Das Molekulargewicht von TRPC6 liegt bei 130 kDa und das der Ladekontrolle β -Aktin bei 43 kDa.

3.2.4 Funktionelle Analyse der TGF- β_1 -induzierten Myofibroblasten-Transformation von Fibroblasten

3.2.4.1 Nachweis von Aktinstressfaserbildung mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin

Die Veränderung der Zellmorphologie von nicht generell kontraktile Zellen – wie primäre Lungenfibroblasten - geht mit einer Veränderung des Zytoskelettes und somit mit einem veränderten Polymerisationsgrad des Aktins einher (Baum et al. 2011, Sandbo et al. 2011). Um dies nachzuweisen kann das filamentöse Aktin (F-Aktin) mittels TRITC-Phalloidin (siehe Abschnitt 2.2.3.5) angefärbt und quantifiziert werden.

Durch immunhistochemische Untersuchungen mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin konnte in den mit Lösungsmittel- und TGF- β_1 -behandelten WT- und TRPC6-defizienten pmLF die Aktinstressfaserbildung nachgewiesen werden (Baum et al. 2011). **Abbildung 50** zeigt repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung. Die zelluläre DNA (Zellkerne) wurde mittels Höchst-Färbung identifiziert. Die Kontrollen beider Genotypen zeigten eine geringe Anfärbung des Zytoskelettes durch Phalloidin und die Zellen besaßen kaum Zellausläufer. Die Behandlung mit TGF- β_1 führte in den WT-pmLF zu einer deutlichen Erhöhung in der Anzahl an Aktinstressfasern. In den TRPC6-defizienten pmLF kam es auch zu einer allerdings signifikant schlechteren Polymerisation des Aktins. Auch die Anzahl an Zellfortsätzen wurde

durch TGF- β_1 -Applikation sowohl in den WT- als auch in den TRPC6-defizienten Zellen erhöht.

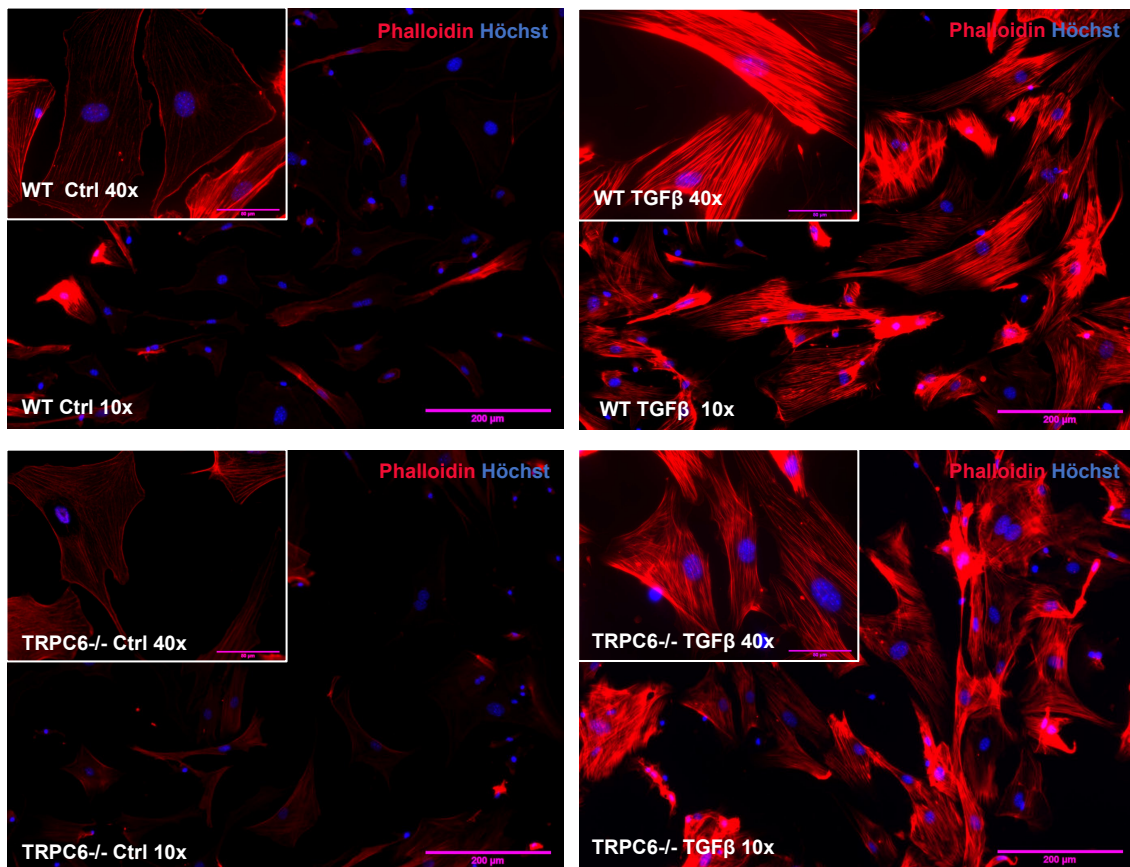


Abbildung 50: Nachweis der Aktinstressfaserbildung in WT- und TRPC6-defizienten pmLF, die mit Lösungsmittel („Ctrl“) oder TGF- β_1 (TGF β) behandelt wurden. Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der Färbung mit TRITC-Phalloidin (F-Aktin; rot) in WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6-/-) pmLF. Der Zellkern wurde mit Höchst-Färbung (blau) identifiziert. Ctrl: Kontrolle; TGF β : TGF- β_1 . Kleine Übersichtsbilder in 40-facher Vergrößerung (40x) sind in der linken oberen Ecke lokalisiert (Größenmarker: 50 μ m). Große Bilder zeigen Ausschnitte der 10-fach (10x) vergrößerten Zellen (Größenmarker: 200 μ m).

Die Aktinstressfaserbildung wurde anschließend über die Auswertung der Graustufenintensität quantifiziert und wird in **Abbildung 51** graphisch dargestellt. Durch die Behandlung mit TGF- β_1 zeigte sich eine signifikante Erhöhung (ungefähr 3 mal höher als in der Kontrolle) der Anzahl an Aktinstressfasern in WT-pmLF. Dieser Anstieg war jedoch in den mit TGF- β_1 -behandelten TRPC6-defizienten pmLF signifikant niedriger (ungefähr 2 mal höher als in der Kontrolle). Ausgewertet wurden je drei Ausschnitte einer Färbung von je drei unabhängigen Versuchen.

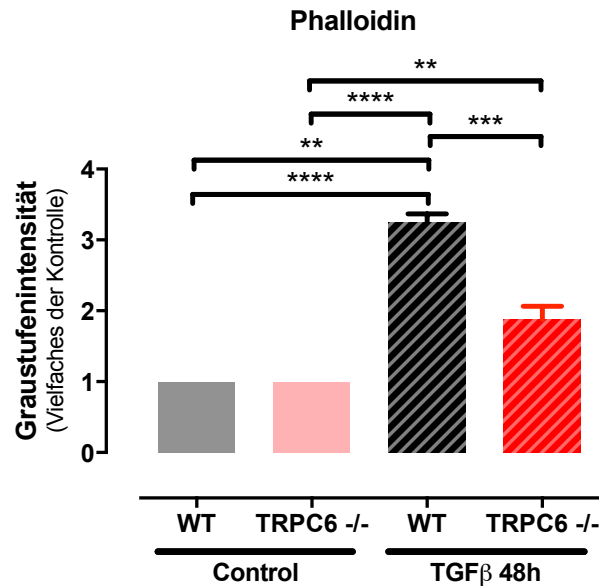


Abbildung 51: Quantifizierung der Aktinstressfaserbildung in WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) pmLF, die mit Lösungsmittel („Control“) oder mit TGF-β₁ („TGF β 48h“) behandelt wurden. Dargestellt ist die Graustufenintensität in TGF-β₁-behandelten und unbehandelten pmLF aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen. n= 3 untersuchte Lungenfibroblastenklone; Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni Post-hoc-Test“. ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.4.2 TRPC6-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom in TGF-β₁-behandelten Lungenfibroblasten

Nach der Klärung der Identität der isolierten Zellen und dem Nachweis der TGF-β₁-induzierten TRPC6-Expression in pmLF, sollte nun die TRPC-Aktivität direkt bestimmt werden.

Nach Stimulation der primär isolierten murinen Lungenfibroblasten mit Lösungsmittel oder TGF-β₁ für 48 Stunden wurden die Zellen mit Fura beladen und der Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen gemessen. Als direkter Aktivator für TRPC6 wurde 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) in einer Endkonzentration von 100 μM verwendet. Das intrazelluläre Calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurde über den Quotient der gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach Exzitation bei 340 nm und 380 nm (Ratio F340/F380) berechnet und die Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen mit Standardabweichungen des Mittelwertes sind in **Abbildung 52** dargestellt. Deutlich zu sehen ist ein Anstieg der Ratio in den TGF-β₁-behandelten WT-pmLF nach Zugabe von OAG. In den Kontrollen beider Genotypen und den TGF-β₁-

behandelten TRPC6-defizienten pmLF kam es durch die Zugabe von OAG zu einem deutlich geringeren Ca^{2+} -Einstrom.

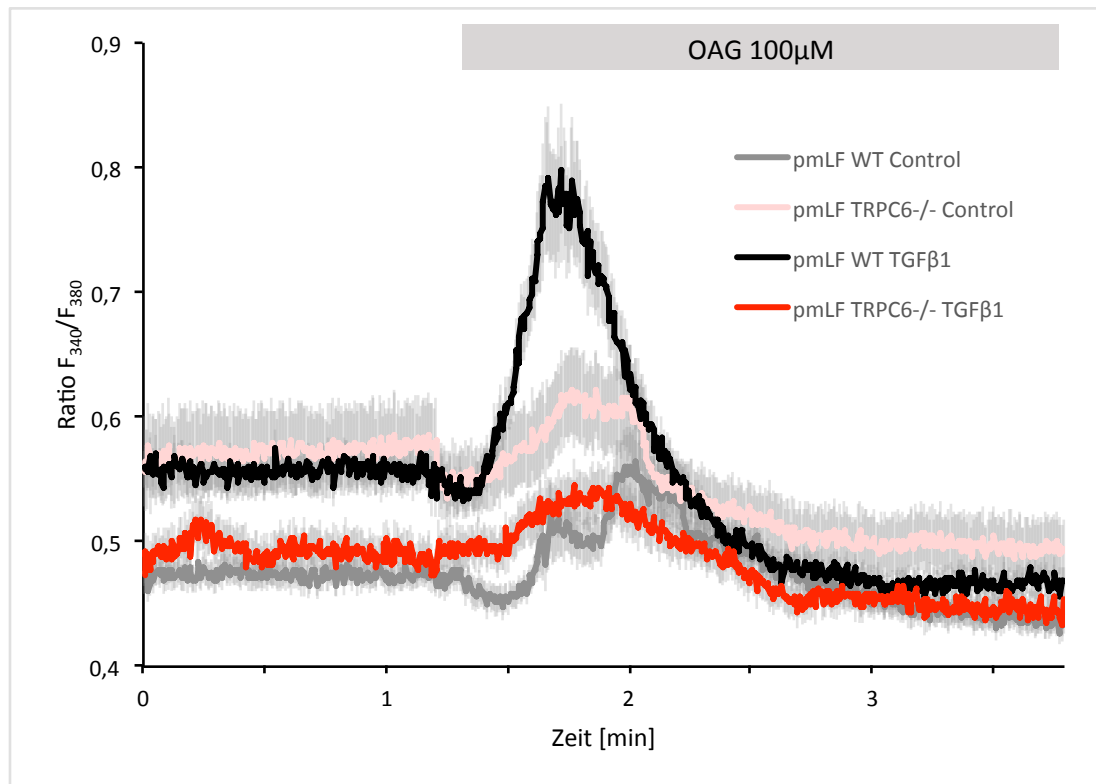


Abbildung 52: Ca^{2+} -Einstrom in mit Lösungsmittel- oder TGF- β_1 -behandelten WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6 $^{-/-}$) pmLF. Dargestellt ist der OAG-induzierte Anstieg des intrazellulären Calciums ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in mit Lösungsmittel-behandelten WT ($n = 40$) und TRPC6-defizienten ($n = 19$) Fibroblasten („Control“) und mit TGF- β_1 -behandelten (TGF β_1) Zellen (WT, $n = 53$; TRPC6 $^{-/-}$, $n = 38$). n = Zellen aus drei Lungenfibroblastenklonen. Das intrazelluläre Calcium $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde über den Quotient der gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach Exzitation bei 340 nm und 380 nm (Ratio F340/F380) berechnet. Die Linien zeigen den berechneten Mittelwert und die hellgraue Schattierungen entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. OAG = 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol.

Um die Veränderung in den Fluoreszenzintensitäten und somit den Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} quantifizieren zu können wurde die sogenannte „Area under the curve“ (AUC) berechnet. Eine Zusammenfassung der Werte ist in **Abbildung 53** zu sehen. Auch hier ist zu erkennen, dass der Einstrom an Ca^{2+} in den mit TGF- β_1 -behandelten WT-pmLF nach Applikation von OAG (100 μM) signifikant höher war als in allen anderen Fibroblasten beider Genotypen. Auch deutlich zu sehen ist, dass der Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} in TRPC6-defizienten pmLF die mit TGF- β_1

behandelt worden waren, signifikant niedriger als in den behandelten WT-Zellen und ähnlich wie in den Kontrollen war.

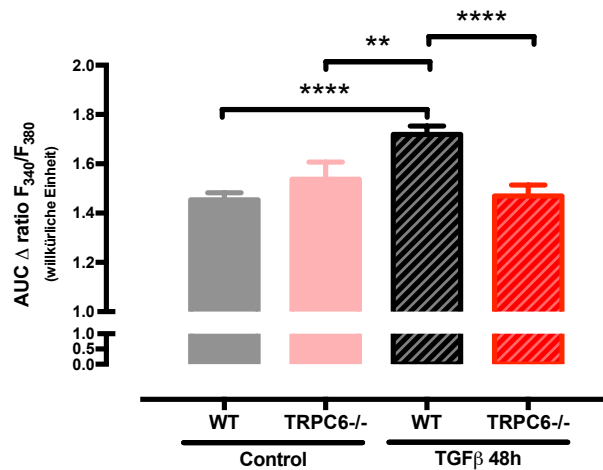


Abbildung 53: Quantifizierung der „Area under the Curve“ (AUC) des OAG-induzierten Ca^{2+} -Einstroms in WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) pmLF die mit Lösungsmittel („Control“) oder TGF- β_1 (TGF β) behandelt wurden. Dargestellt sind die Werte der AUCs nach OAG-Zugabe in mit Lösungsmittel-behandelten (WT, n= 40; TRPC6^{-/-}, n= 19) Fibroblasten („Control“) und mit TGF- β_1 differenzierte Zellen (WT, n= 53; TRPC6^{-/-}, n= 38). n= Zellen aus 3 Klonen. Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Newman-Keuls Post-hoc-Test“. ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. OAG = 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol.

3.2.4.3 TGF- β_1 -vermittelte Änderung der Lokalisation des Transkriptionsfaktors „nuclear factor of activated T-cells (NFAT)“ in WT und TRPC6-defizienten Fibroblasten

TRPC-Kanäle vermitteln ihre biologischen Effekte unter anderem über einen Ca^{2+} -Einstrom und Ca^{2+} -abhängige Signaleffektoren, wie z.B. den Calcineurin-NFAT-Signalweg. Um die Konsequenzen des Ca^{2+} -Einstroms in WT- und TRPC6-defizienten Fibroblasten die mit Lösungsmittel oder TGF- β_1 behandelt worden waren näher zu analysieren wurden zusammen mit Frau Susanne Fiedler in nukleären Proteinlysaten die Isoform c1 des „nuclear Factor of activated T-cells“ (NFAT)-Proteins (NFATc1) quantifiziert. Die **Abbildung 54 A** zeigt einen repräsentativen Western Blot von NFATc1 im Nukleus von pmLF nach der Behandlung mit Lösungsmittel oder TGF- β_1 . Als Ladekontrolle wurde ein spezifischer Antikörper der Firma Thermo Fisher Scientific gegen Lamin B1 verwendet. Deutlich zu erkennen ist ein Anstieg an nukleärem NFATc1-Protein nach Behandlung mit TGF- β_1 in den

pmLF von beiden Genotypen bezogen auf die jeweilige Kontrolle (mit Lösungsmittel behandelte pmLF). Um die NFATc1-Expression zu quantifizieren wurde der Western Blot mit pmLF aus mehreren Isolationen wiederholt und die nukleäre NFATc1-Expression auf die Ladekontrolle Lamin B1 normiert. Die Quantifizierung der NFATc1-Isoform ist in **Abbildung 54 B** graphisch als Vielfaches bezogen auf die Kontrolle dargestellt. Bei den behandelten TRPC6-defizienten pmLF zeigt sich ein ca. 2-facher Anstieg an nukleärem NFATc1, während dieser in den WT-pmLF signifikant höher (ca. 2,5-fach) nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der TRPC6-induzierte Ca^{2+} -Einstrom für die Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung und nukleäre Translokation des NFATc1 verantwortlich ist, wie auch schon in Herz- und Hautfibroblasten beschrieben (Davis et al. 2012).

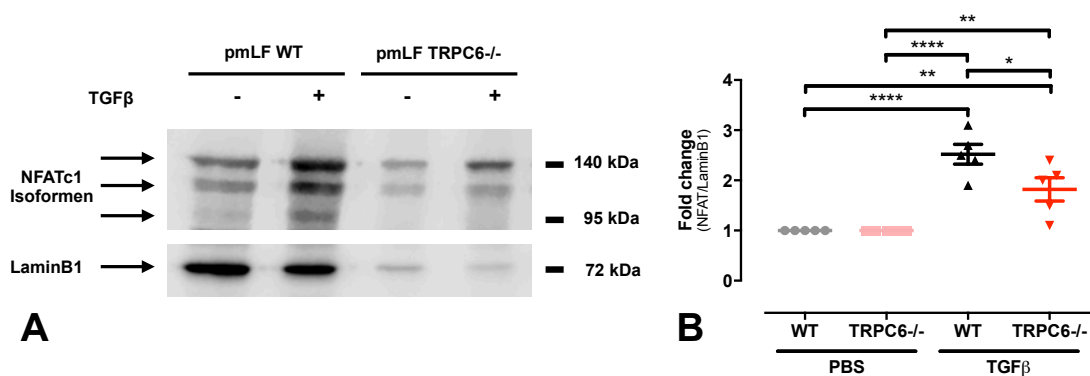


Abbildung 54: Nachweis der NFATc1-Translokation in den Zellkern von pmLF nach der Behandlung mit TGF- β_1 oder Lösungsmittel mittels Western Blot. A) Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus nukleären pmLF-Lysaten. Die NFATc1-Isoformen im Zellkern zeigen Banden bei einem Molekulargewicht von 90, 100 und 140 kDa; Die Ladekontrolle Lamin B1 wurde bei einem Molekulargewicht von 70 kDa detektiert. B) Quantifizierung der nukleären NFATc1-Expression in WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6^{-/-}) pmLF. Dargestellt ist die NFATc1-Expression als Vielfaches der Kontrolle in mit TGF- β_1 - oder Lösungsmittel-behandelten pmLF bezogen auf die Ladekontrolle Lamin B1. n = 5 untersuchte Lungenfibroblastenklone; Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni Post-hoc-Test“. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes. (-): Lösungsmittel-behandelte pmLF (Kontrolle); (+): TGF- β_1 -behandelte pmLF. NFATc1: „nuclear Factor of activated T-cells“ Isoform c1; TGFβ: TGF- β_1 ; PBS: Lösungsmittel.

3.2.4.4 Rolle des TRPC6-Kanals für die TGF- β_1 -induzierte Erhöhung der Barrierefunktion von pmLF

Um die Veränderung des Zellwiderstandes während der Inkubation von pmLF mit TGF- β_1 kontinuierlich zu messen wurde ein „Electric-Cell-Substrate Impedance sensing“ (ECIS)-System benutzt. Bei der Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten kommt es zu einer erhöhten Bildung von Extrazellulärer Matrix (Eyden 2008, Klingberg et al. 2013, Fernandez et al. 2012, Baum et al. 2011) was zu einem erhöhten Widerstand der Zelle gegenüber den Elektroden führt (Giaever et al. 1984). In **Abbildung 55** ist der Verlauf der Widerstandsmessung von WT- und TRPC6-defizienten pmLF nach Zugabe von TGF- β_1 oder Lösungsmittel dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Widerstandes über 48 h nach Behandlung mit TGF- β_1 im Vergleich zu den Lösungsmittel-Kontrollen. In den ersten 12 h nach Zugabe von TGF- β_1 unterschied sich der Zellwiderstand zwischen den Genotypen nicht. Dann jedoch stieg in den WT-pmLF im Gegensatz zu den TRPC6-defizienten pmLF der Widerstand signifikant an.

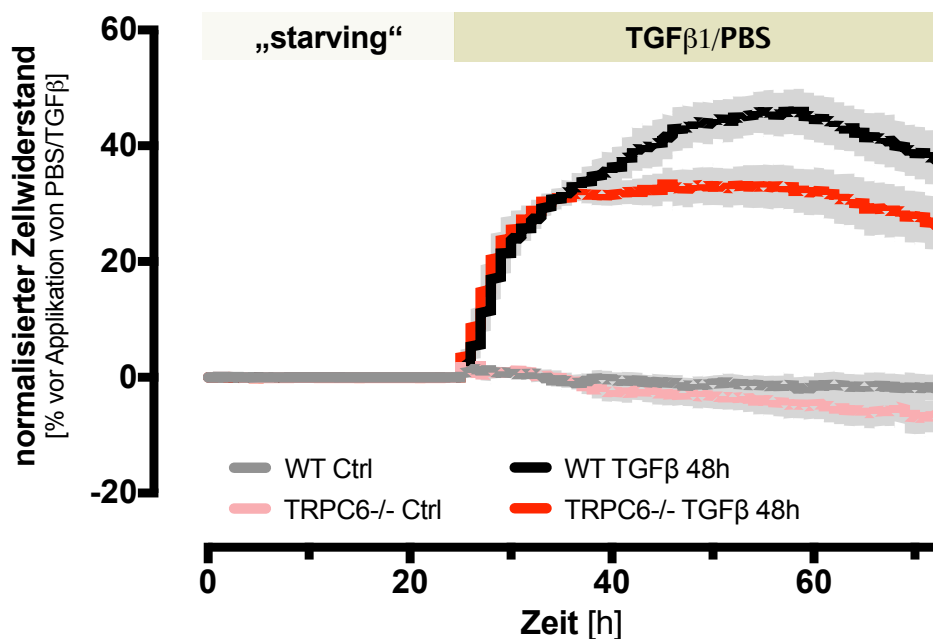


Abbildung 55: Analyse des Zellwiderstandes in mit TGF- β_1 („TGF β 48h)- oder Lösungsmittel („Ctrl“)- behandelten pmLF. PmLF aus WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6-/-) Mäusen wurden auf den ECIS-Elektroden ausgesät und mit TGF- β_1 (WT, n=10; TRPC6-/-, n=8) oder Lösungsmittel (PBS; WT, n=7; TRPC6-/-, n=6) behandelt. Die Messwerte des Zellwiderstandes wurden auf den Wert vor TGF- β_1 -Zugabe normiert (normalisierter Zellwiderstand). Die Linien zeigen den berechneten Mittelwert und die Schattierungen zeigen den Standardfehler des Mittelwertes. n= Experimente aus 5 Lungenfibroblastenklonen; Ctrl: PBS-Kontrolle.

Um die Veränderung des Zellwiderstandes zu quantifizieren wurde die sogenannte „Area under the Curve“ (AUC) ausgewertet. Eine statistische Darstellung wird in **Abbildung 56** gezeigt. Die Behandlung mit TGF- β_1 erhöht die AUC in den WT- und den TRPC6-defizienten Zellen signifikant gegenüber den Lösungsmittel-Kontrollen. Die Erhöhung des Zellwiderstandes in den TGF- β_1 -behandelten TRPC6-defizienten pmLF war aber nach 48 h auch signifikant niedriger als in den TGF- β_1 -behandelten WT-pmLF.

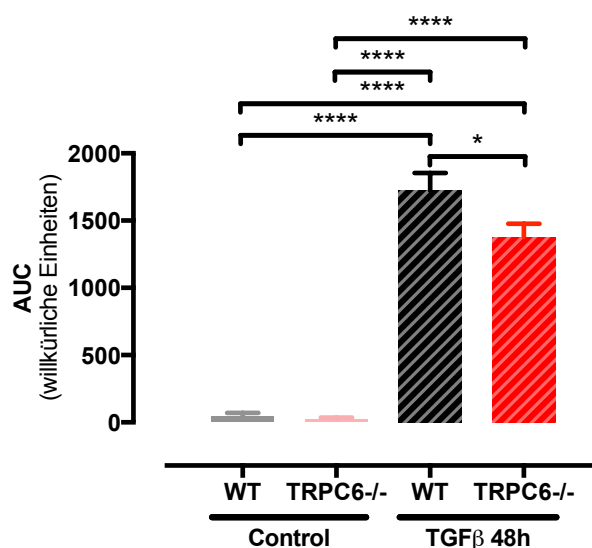


Abbildung 56: Quantifizierung der „Area under the Curve“ (AUC) der Widerstandsmessungen in pmLF. Dargestellt sind die Werte der AUCs von WT- und TRPC6-defizienten (TRPC6-/-) Fibroblasten nach 48 h Behandlung mit TGF- β_1 (WT, n=10; TRPC6-/-, n=8) oder Lösungsmittel („Control“; WT, n=7; TRPC6-/-, n=6). n= Experimente aus 5 Lungenfibroblastenklonen. Getestet wurde mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Bonferroni's Post-hoc-Test“. * = Signifikanzniveau $p < 0,05$; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

3.2.4.5 Kontraktionsassay

Fibroblasten und Myofibroblasten sind in der Lage eine Kollagenmatrix zu kontrahieren. Durch die veränderte Zellmorphologie, d.h durch die vermehrten kontraktile Eigenschaften (Aktinstressfasern), sollten mit TGF- β_1 -behandelte Fibroblasten die Matrix allerdings stärker kontrahieren. Um die kontraktile Eigenschaften näher zu untersuchen wurden WT- und TRPC6-defiziente pmLF in einer Kollagenmatrix ausgesät und mit TGF- β_1 oder Lösungsmittel (Kontrolle) behandelt. Nach 48 Stunden wurde das Gel von den Gefäßrändern gelöst und die

Kontraktion der Gelmatrix nach 120 min vermessen. **Abbildung 57 A** zeigt repräsentative Bilder der kontrahierten Matrices mit pmLF beider Genotypen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die TGF- β_1 -behandelten WT- und TRPC6-defizienten Fibroblasten die Matrix stärker kontrahieren als die mit Lösungsmittel-behandelten Fibroblasten beider Genotypen. Das Experiment wurde mehrmals mit verschiedenen Lungenfibroblastenklonen wiederholt und die Prozentzahlen der Kontraktion sind in der quantitativen Auswertung in **Abbildung 57 B** dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die signifikant stärkere Kontraktion der Kollagenmatrix durch TGF- β_1 -behandelte pmLF verglichen mit den Lösungsmittel-behandelten pmLF (Kontrolle). Die basale Kontraktion von mit Lösungsmittel-behandelten TRPC6-defizienten pmLF war signifikant niedriger als die der mit Lösungsmittel-behandelten WT-pmLF und erhöhte sich nach TGF- β_1 -Behandlung auf einen Wert ähnlich zu den mit Lösungsmittel-behandelten WT-pmLF. Der Grund für die schwächere Kontraktion der Kollagenmatrix durch die TRPC6-defizienten pmLF ist unbekannt und muss noch näher untersucht werden.

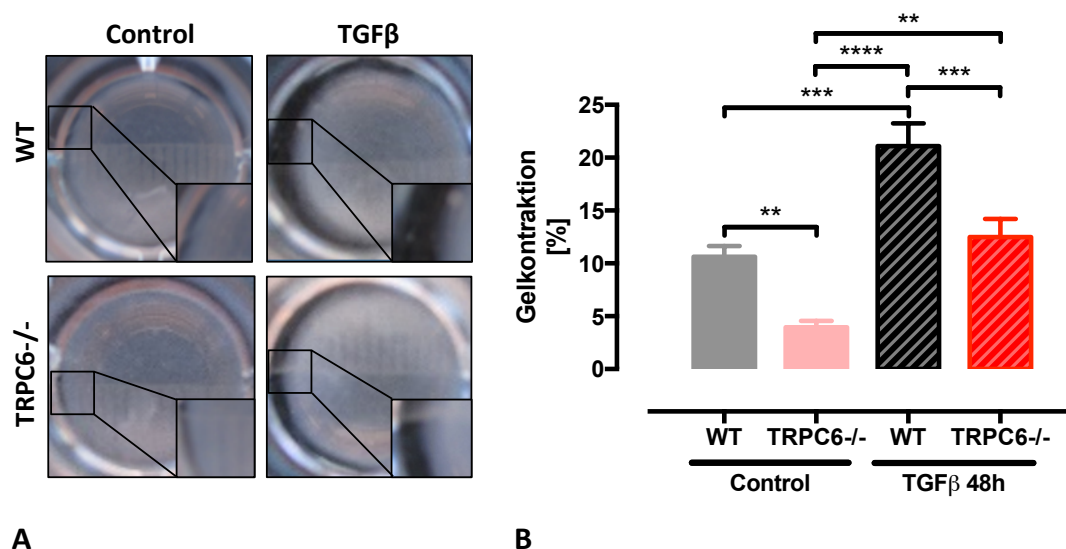


Abbildung 57: Analyse der Kontraktion einer Kollagenmatrix durch pmLF, die mit TGF- β_1 (TGF β 1 48h) oder Lösungsmittel („Control“) behandelt wurden. A) Repräsentative Bilder von Kollagenmatrices mit pmLF aus WT oder TRPC6-defizienten (TRPC6-/-) Mäusen, die von den Gefäßwänden abgelöst wurden. Die Ausschnittsvergrößerungen zeigen den Abstand zur Gefäßwand. B) Quantifizierung der Kontraktion der Kollagenmatrices in WT- und TRPC6-defizienten pmLF. n= Experimente 6 aus 6 Lungenfibroblastenklonen; Statistische Analyse mittels „One-way ANOVA“ gefolgt von einem „Newman-Keuls Post-hoc-Test“. ** = Signifikanzniveau $p < 0,01$; *** = Signifikanzniveau $p < 0,001$; **** = Signifikanzniveau $p < 0,0001$; Die angegebenen Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwertes.

4 Diskussion

Die physiologische Wundheilung nach einer Verletzung des Lungengewebes ist hauptsächlich von aktivierten Fibroblasten, sogenannte Myofibroblasten, abhängig und soll die Lungenarchitektur wiederherstellen. Wenn diese Fibroblasten jedoch überaktiv sind und die Wundheilung außer Kontrolle gerät, kommt es zu einem überschüssigen Umbau des Lungengewebes und zur Zerstörung der Lungenarchitektur wie bei der Entwicklung einer Lungenfibrose (PF). In der fibrotischen Lunge wandern aktivierte Fibroblasten ins Interstitium ein, bilden Myofibroblasten-Foci und setzen eine große Menge an extrazellulärer Matrix frei.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Rolle des TRPC6-Kanals während der Ausbildung einer PF *in vivo* und während der Myofibroblasten-Differenzierung *in vitro* gezeigt werden. Obwohl schon viel über aktivierte Fibroblasten/Myofibroblasten während der Ausbildung einer Lungenfibrose berichtet wurde (Eyden 2008, Klingberg et al. 2013), ist ihr Einfluss bisher nur teilweise verstanden.

TRPC6-defiziente Mäuse waren im Bleomycin-induzierten Fibrosemodell vor der Ausbildung einer PF geschützt, da ihre Überlebensrate sich nicht signifikant von der mit PBS-behandelten TRPC6-defizienten oder Wildtyp (WT)-Kontrollmäusen unterschied. Die Bleomycin-behandelten WT-Mäuse zeigten jedoch eine signifikant geringere Überlebensrate im Vergleich zu den mit PBS-behandelten TRPC6-defizienten und WT-Mäusen. Die meisten Parameter für die Lungenfunktion (**Abbildung 29**, **Abbildung 30**, **Abbildung 31**) ebenso wie die mRNA-Expression bestimmter Proteine der extrazellulären Matrix und der Fibrosemarker (**Abbildung 34** und **Abbildung 35**) sowie der Kollagengehalt (**Abbildung 36**) Bleomycin-behandelter TRPC6-defizienten Lungen unterschieden sich nicht signifikant von den erhaltenen Werten der PBS-Kontrollen.

In vitro konnten keine morphologischen Unterschiede zwischen primären murinen Lungenfibroblasten (pmLF) aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen detektiert werden (**Abbildung 44**). Die Behandlung der pmLF mit TGF- β_1 induzierte in WT-pmLF eine Expression des TRPC6-Kanals, der nach Aktivierung durch OAG eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkte (**Abbildung 52**). Zusätzlich war die TGF- β_1 -induzierte Ausbildung von Aktinstressfasern in den

TRPC6-defizienten Myofibroblasten signifikant vermindert (**Abbildung 50**). Auch die basale Zellkontraktion der (Myo)Fibroblasten als ein charakteristisches Zeichen für das Fortschreiten einer PF (John-Schuster et al. 2014, White 2015) war in den TRPC6-defizienten Zellen im Vergleich zu deren WT-Kontrollen nach Behandlung mit TGF- β_1 vermindert (**Abbildung 57**). Alle diese Ergebnisse beweisen nach meinem Wissensstand zum ersten Mal eine Beteiligung des TRPC6-Kanals während der Ausbildung einer PF. Auf molekularer Ebene kann dem TRPC6-Kanal aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit eine wichtige Bedeutung während der Myofibroblastentransformation zugeschrieben werden.

4.1 Rolle des TRPC6-Kanals während der Ausbildung einer experimentellen Lungenfibrose (*in vivo*)

4.1.1 Evaluation des verwendeten Mausmodells

Das Bleomycin-induzierte Mausmodell ist eine sehr gut etablierte Methode um *in vivo* eine Lungenfibrose (PF) zu induzieren (Degryse et al. 2011). In dieser Arbeit wurde, wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben, eine intratracheale Einmalapplikation von 3U/kg KG Bleomycin in C57BL/6-Mäusen verwendet um die Rolle des TRPC6 *in vivo* während der Ausbildung einer PF zu untersuchen. In den ersten sieben Tagen nach der Bleomycin-Applikation kommt es zu einer starken Entzündungsreaktion, in der die Tiere an Gewicht verlieren. Anschließend folgt die Einwanderung von Fibroblasten und Myofibroblasten in die Alveolar-Kapillarmembran. Durch die Verdickung der Membran wird der Gasaustausch erschwert und es kann zu Todesfällen kommen. Ab Tag 21 heilt die transiente Lungenfibrose im murinen Modell wieder aus. (Chaudhary et al. 2006)

Diese Methode hat gegenüber anderen Tiermodellen für PF einige Vorteile. Die Zeit bis sich die Fibrose ausbildet ist, speziell bei der intratrachealen Einmalgabe, kürzer als zum Beispiel bei einer durch Bestrahlung verursachten PF - hier dauert es bis zu 20 Wochen bis sich eine Lungenfibrose entwickelt (McDonald et al. 1993). Beim sog. Quarz-Modell (Silikose) entwickelt sich eine multinoduläre Lungenfibrose, da es durch die intratracheale oder oropharyngeale Applikation einer Quarzstaub-Suspension zu fibrotischen Veränderungen um die Quarzkristalle herum kommt (Moore et al. 2013). Darüber hinaus zeichnet sich die Bleomycin-induzierte

Lungenfibrose durch eine einfache Anwendung ohne besondere technische Ausrüstung aus. (Mouratis et al. 2011, Moore et al. 2013)

Jedoch kann das Bleomycin-Modell, wie die meisten anderen Tiermodelle, den pathologischen Mechanismus der PF im Menschen nur teilweise simulieren. Es zeigt sich das histologische Erscheinungsbild der interstitiellen Lungenfibrose, wie z.B. die heterogen verteilte Entzündung und Fibrose, d.h. Lungengewebe mit fibrotischen Veränderungen neben histologisch normalen Gewebe, und bis zu einem gewissen Ausmaß ist auch die typische Honigwabenstruktur („Honeycombing“) sichtbar. Jedoch fehlen andere typische Merkmale, gerade im Vergleich zum humanen Erscheinungsbild. Hierzu zählt die Lokalisation der Fibrose, die beim Menschen weitestgehend basal und subpleural, im Mausmodell aber eher peribronchial auftritt. Zusätzlich fehlen im Mausmodell die typischen Ansammlungen von Fibroblasten („Fibroblasten Foci“). Eine weitere Diskrepanz zeigt sich in der initialen, starken Entzündungsreaktion, die beim Menschen fehlt. Der größte Kritikpunkt am Bleomycin-Mausmodell ist jedoch die Reversibilität der Lungenfibrose, die sich stark von der langsam fortschreitenden, irreversible Erkrankung des Menschen unterscheidet. (Degryse et al. 2011, Mouratis et al. 2011, Moore et al. 2013)

Hinzu kommt, dass sich die Anfälligkeit für die Ausbildung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose stark innerhalb der verschiedenen Maus-Rassen unterscheidet. So reagieren zum Beispiel Balb/c Mäuse kaum auf die Bleomycin-Behandlung, da sie Bleomycin-Hydrolasen exprimieren die das Bleomycin inaktivieren. Deshalb wurden in dieser Arbeit C57BL/6 Mausweibchen verwendet, die am besten für die beschriebene Ausbildung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose geeignet sind (Chung et al. 2003, Degryse et al. 2011). Das Bleomycin kann intravenös, subkutan oder intratracheal appliziert werden. Je nach Applikationsart kommt es zu unterschiedlichen Schädigungen der Lunge und einem variierenden Zeitverlauf der PF. Auch die Dosis kann von 1 bis 5U/kg KG variieren. In dieser Arbeit wurde den Mäusen 3U/kg/KG Bleomycin intratracheal verabreicht. Aus den genannten Gründen erwies sich die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose als das beste Modell für initiale Experimente. Es muss jedoch in Zukunft geprüft werden, ob sich die - in dieser Doktorarbeit gesammelten - Daten auf andere Mausmodelle der Lungenfibrose und die Ausbildung der Krankheit im Menschen übertragen lassen.

4.1.2 Ergebnisse des Vergleichs von Wildtyp- und TRPC6-defizienten Mäusen im Bleomycin-induzierten Lungenfibrosemodell

Der nach der Bleomycininstillation zunächst auftretende Gewichtsverlust ist ein Zeichen für eine schwere systemische Erkrankung mit einer starken Entzündungsreaktion, sowie einer Erhöhung des Energieverbrauchs und der Proliferationsrate. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es hinsichtlich des Gewichtverlaufs und der Überlebensrate bei den WT- und TRPC6-defizienten Mäusen nach der Behandlung mit PBS (=Kontrolle) keinen Unterschied gab. Nach der Gabe von Bleomycin verloren sowohl die WT- als auch die TRPC6-defizienten Mäuse signifikant an Gewicht. Ab Tag 7 pendelte sich ein konstantes, bei beiden Genotypen ähnliches, Körpergewicht ein, welches signifikant ca. 20% niedriger als in den Kontrollmäusen war.

Ab Tag 7 mit dem Beginn der Fibrosephase unterschieden sich die Genotypen jedoch hinsichtlich ihrer Mortalität (Überlebensrate). Nach der Behandlung mit Bleomycin starb während der fibrotischen Phase eine signifikant höhere Anzahl an Mäusen in der WT-Gruppe als in allen anderen Versuchsgruppen. Die mit Bleomycin behandelten TRPC6-defizienten Mäuse zeigten im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrolltieren keine signifikant veränderte Überlebensrate. Außerdem wiesen die TRPC6-defizienten Mäuse nach der Behandlung mit Bleomycin eine signifikant bessere Lungenfunktion (Lungenwiderstand und Elastizität) als die fibrösen WT-Mäuse auf. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Komponenten der extrazellulären Matrix (Fn1 und Coll1 α 1) und die Fibrosemarker (α SMA und PAI-1) auf mRNA-Ebene in den Bleomycin-behandelten TRPC6-defizienten Lungen deutlich niedriger exprimiert waren als in den behandelten WT-Lungen. Auf Proteinebene konnte für Kollagen im Gegensatz zu den Bleomycin-behandelten WT-Mäusen keine erhöhte Expressionsrate nachgewiesen werden. Die Kollagenproduktion in den mit Bleomycin-behandelten TRPC6-defizienten Lungen am Tag 14 war im Vergleich zu den PBS-Kontrollen sogar unverändert.

Beide Genotypen, WT und TRPC6-defiziente Mäuse, verloren in der ersten 7 Tagen in der Entzündungsphase Gewicht und erholten sich in den darauffolgenden 7 Tagen nicht. Dies deutet daraufhin, dass TRPC6 während der Entzündungsphase im Gegensatz zur Fibrosephase keine essentielle Rolle übernimmt. Wann und in welchem Umfang sich die Mäuse wieder erholen und ihr Ursprungsgewicht wieder erreichen, muss in Zukunft noch untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Fehlen des TRPC6-Proteins während der Ausbildung der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in Mäusen einen protektiven Effekt hat. Fehlende TRPC6-Aktivität verhinderte einen fibrösen Umbau und somit die Versteifung der Lunge, was durch eine bessere Lungenfunktion, weniger extrazelluläre Matrix und eine bessere Überlebensrate in den TRPC6-defizienten Mäusen gezeigt wurde. In WT-Tieren kommt es hingegen nach Behandlung mit Bleomycin in der Gesamtlunge zu einer starken Ausbildung einer Lungenfibrose. Ermutigt von diesen Ergebnissen wurden nun primäre murine Lungenfibroblasten (pmLF) isoliert, um die Unterschiede zwischen den Genotypen auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen.

4.2 Rolle des TRPC6-Kanals in Lungenfibroblasten (*in vitro*)

Es ist allgemein bekannt, dass Fibroblasten einen großen Anteil am Verlauf der PF haben, indem sie für die Produktion der extrazellulären Matrix verantwortlich und an der Differenzierung zu Myofibroblasten beteiligt sind (McAnulty 2007, Hinz 2007, Scotton et al. 2007). Das von Epithel- oder inflammatorischen Zellen sezernierte TGF- β_1 aktiviert Fibroblasten, die sich zu Myofibroblasten mit vermehrter Produktion von extrazellulärer Matrix und einem kontraktilem Phänotyp differenzieren (Scotton et al. 2007, Bartram et al. 2004, de BOER et al. 1998, Chung 2001).

Um die Rolle des TRPC6-Kanals während der Fibroblasten-Myofibroblasten-Transformation zu analysieren wurden pmLFs aus WT- und TRPC6-defizienten Mäusen isoliert und mittels Stimulation durch das profibrotische Zytokin TGF- β_1 die Myofibroblasten-Differenzierung induziert und analysiert.

4.2.1 Isolation der pmLF und Identifizierung der Zellen

In vielen Studien werden immortalisierte Zelllinien als Fibroblasten verwendet. Es wird jedoch bezweifelt, dass diese Zellen wirklich native Fibroblasten in Experimenten ersetzen können. Durch die Immortalisierung kann die Expression von verschiedenen Genen verändert werden, weshalb für diese Arbeit Lungenfibroblasten frisch aus der Maus isoliert wurden.

Zunächst wurden die isolierten pmLFs auf Identität und Reinheit untersucht. Die verwendete Isolationsmethode wurde im Labor von Prof. Eickelberg für humane Lungenfibroblasten etabliert (Staab-Weijnitz et al. 2015, Heinzelmann et al. 2016)

(vergleiche Abschnitt 2.2.2.4). Es war dann für die nachfolgenden Versuche von großer Bedeutung die zelluläre Identität und Reinheit der Zellen zu klären. Hierzu wurde zunächst die eindeutige Morphologie der Zellen (viele Zellfortsätze; ovaler, hellerer Zellkern mit deutlich erkennbarem Nukleolus und viel raues Endoplasmatisches Retikulum; Eyden 2008) herangezogen (vergleiche Abschnitt 3.2.2.1). Darüber hinaus wurde die Genexpression von mesenchymalen Markerproteinen (Fn1, Coll1 α 1 und α SMA) analysiert und auf Proteinebene mittels Färbung mit Immunofluoreszenz-markierten spezifischen Antikörpern nachgewiesen (vergleiche Abschnitt 3.2.1). Es zeigten sich sowohl morphologisch als auch in der Gen- und Proteinexpression keine Unterschiede zwischen WT- und TRPC6-defizienten pmLFs (vergleiche Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Auf mRNA-Ebene konnte mittels quantitativer „reverse-transcription“ (qRT)-PCR eine starke Expression des TRPC1-Kanals und eine nur geringe Expression des TRPC6-Kanal in den WT-Zellen nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 45**). In den gendefizienten pmLFs konnte kein TRPC6-Kanal auf Proteinebene identifiziert werden (siehe **Abbildung 49**). Außerdem gab es zwischen den Genotypen keine Unterschiede in der mRNA-Expression der restlichen TRPC-Kanäle (siehe **Abbildung 45**).

Allerdings sind die Fibroblasten nicht der einzige Zelltyp, der an der Entwicklung einer Lungenfibrose beteiligt ist (Strieter et al. 2009, Königshoff et al. 2014, Maharaj et al. 2013, King et al. 2011, Davis et al. 2012). Aus diesem Grund wird besonders auch die Rolle von TRPC6 in Lungenepithel- und Endothel-Zellen in Zukunft in unserer Arbeitsgruppe untersucht werden.

4.2.2 Nachweis der Fibroblasten-Myofibroblasten-Transformation in pmLF nach TGF- β ₁-Behandlung unter Beteiligung des TRPC6-Kanals

Das Zytokin TGF- β ₁ aktiviert Fibroblasten und stimuliert deren Differenzierung zu Myofibroblasten, welche vermehrt extrazellulärer Matrix produzieren und nun einen kontraktileren Phänotyp annehmen (Baum et al. 2011, Scotton et al. 2007). Der kontraktile Phänotyp war in den zu Myofibroblasten differenzierten TRPC6-defizienten Fibroblasten deutlich verringert, was durch eine signifikant verminderte Anzahl an Aktinstressfasern und eine in einer Kollagenmatrix eingeschränkte Zellkontraktilität gezeigt werden konnte. Die Fähigkeit zur Kontraktion ist essentiell für die Zellmotilität (Pathak et al. 2011) und somit wichtig für die Einwanderung der Myofibroblasten in die fibrotischen Plaques (Hinz 2010). Die erhöhte Expression der

Myofibroblasten-Differenzierungsmarker (α SMA und PAI-1) in den TGF- β_1 -behandelten WT-pmLFs untermauert die Beteiligung des TRPC6-Kanals bei der Myofibroblasten-Transformation. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass der TRPC6-Kanal in den Myofibroblasten eine wichtige Rolle spielt und bestätigt die Ergebnisse in Herz- und Hautfibroblasten (Davis et al. 2012). Die Arbeitsgruppe von Prof. Molkentin konnte in Herz- und Hautfibroblasten zeigen, dass der TRPC6-Kanal die Ca^{2+} -abhängige Calcineurin/NFAT-Kaskade aktiviert (Davis et al. 2012). NFAT ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der in Anwesenheit von Ca^{2+} die Phosphatase Calcineurin A aktiviert. Calcineurin A wiederum dephosphoryliert NFAT im Zytoplasma, damit das Protein nach Translokation in den Nukleus die Transkription von den EZM-Komponenten Fn1, α SMA und Coll1 α 1 induzieren kann (Bosc et al. 2005, Cobbs et al. 2007, L  jard et al. 2007).

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es durch die Behandlung mit TGF- β_1 zu einem erhöhten zellulären Widerstand in WT-pmLF kommt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes -mit Hilfe des ECIS („Electrical Cell Impedance Sensing“)-Geräts konnte der Zellwiderstand der Fibroblasten nach der Behandlung mit TGF- β_1 kontinuierlich analysiert werden. Die Veränderungen im elektrischen Widerstand reflektieren morphologische Veränderungen der Zellen und ihrer Barrierefunktion (Giaever et al. 1984). Für die Analyse von Veränderungen des Zytoskelettes wurde schon 1984 dieses Gerät verwendet und eine Inhibition der Aktin-Polymerisation einer Fibroblastenzelllinie durch Cytochalasin B nachgewiesen. In **Abbildung 56** dieser Arbeit zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Barrierefunktion der primären Lungenfibroblasten nach TGF- β_1 -Behandlung in WT-pmLFs durch einen signifikanten Anstieg im zellulären Widerstand.

Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass die TGF- β_1 -induzierte Expression des TRPC6-Kanals in pulmonalen Myofibroblasten und ein TRPC6-abhängiger Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} nur in WT-Fibroblasten nachweisbar war. Die nukleäre NFAT-Lokalisation, sowie die Kollagen-Produktion und Zellkontraktion, welche die PF vorantreiben und eine verminderte Lungenfunktion zur Folge haben, waren in TRPC6-defizienten Fibroblasten deutlich reduziert. Diese Daten stimmen mit den publizierten Ergebnissen für Herz- und Hautfibroblasten (Davis et al. 2012)   berein und unterstreichen die Bedeutung des TRPC6-Kanals für die Umwandlung von Fibroblasten zu Myofibroblasten mit einem kontraktileren Phänotyp.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der erhöhte Ca^{2+} -Einstrom als Folge der erhöhten TRPC6-Expression in den Lungenfibroblasten über die Ca^{2+} -abhängige Calcineurin/NFAT-Kaskade die Differenzierung zu Myofibroblasten induziert. Durch die Umwandlung in den kontraktileren Phänotyp kommt es zu einer verstärkten Kontraktilität und einem erhöhten zellulärem Widerstand der Zellen. Jedoch schließen die Ergebnisse aus dieser Arbeit nicht aus, dass der TRPC6-Kanal auch in anderen Zelltypen der Lunge (z.B. Fibrozyten, Perizyten, Endothel- oder Epithelzellen) eine Rolle während der Entwicklung einer Lungenfibrose spielen kann (Strieter et al. 2009, Montorfano et al. 2014, Hashimoto et al. 2004, Hung et al. 2013, Königshoff et al. 2014, Tanjore et al. 2011), was in unserem Labor weiter untersucht wird.

4.2.3 TRP-Kanäle während der Myofibroblasten-Transformation

Während der Durchführung meiner Doktorarbeit wurde ein weiteres Mitglied der TRP Superfamilie als wichtiger Akteur während der Ausbildung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in Mäusen identifiziert (Rahaman et al. 2014). Der TRP vanilloid 4 (TRPV4)-Kanal ist ein unselektiver Kationenkanal der ubiquitär in den verschiedensten Zelltypen, u.a. in Fibroblasten (Rahaman et al. 2014), exprimiert wird und der ursprünglich als Osmosensor im *C. elegans* identifiziert wurde (Strotmann et al. 2000, Liedtke 2008, Vriens et al. 2004). TRPV4-defiziente Mäuse waren ähnlich wie TRPC6-defiziente Mäuse vor der Ausbildung einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose geschützt. Eine erhöhte TRPV4-Aktivität war in Zellen, die auf Matrices mit steigender Steifigkeit ausgesät worden waren, nachweisbar. Jedoch ist die Rolle des TRPV4-Kanals in Lungenfibroblasten deutlich von der in dieser Arbeit identifizierten Rolle des TRPC6-Kanals zu unterscheiden. Der TRPV4-Kanal wird konstitutiv in Lungenfibroblasten exprimiert und seine Expression wird nicht durch $\text{TGF-}\beta_1$ induziert. Seine Aktivierung erfolgt durch eine erhöhte Steifigkeit der Zellen nach gesteigerter Sekretion extrazellulärer Matrix (EZM) (Rahaman et al. 2014). Daher ist der TRPV4-Kanal in Patienten mit einer schweren Form der PF wahrscheinlich für die finalen Schritte des Krankheitsverlaufes verantwortlich, während der TRPC6-Kanal in der initialen Phase der PF eine Rolle spielt. Darüber hinaus zeigen TRPC6-defiziente Myofibroblasten eine verminderte Kontraktion im Kollagen-Kontraktionsassay, was die Migration der Zellen zu den fibrotischen Plaques inhibiert und vorteilhaft für den Gasaustausch in den Alveolen ist.

Vergleichbare Ergebnisse konnten bisher nicht für TRPV4-defiziente Myofibroblasten gezeigt werden. Sowohl für den TRPV4- (Thorneloe et al. 2012) als auch für den TRPC6-Kanal (Urban et al. 2012, Urban et al. 2016) existieren bereits Kanalinhhibitoren. Ein oral applizierter TRPV4-Blocker mit einer niedrigen IC_{50} von 2-40 nM war bereits effektiv bei der Behandlung von Lungenödemen (Thorneloe et al. 2012). TRPC6-Kanäle werden durch Larixylderivate 12x stärker inhibiert als die nahverwandten TRPC3-Kanäle mit einer IC_{50} von 100-600 nM (Urban et al. 2016). Interessanterweise wurde eine durch TRPC6-Aktivität initiierte akute hypoxische Vasokonstriktion in Mäuselungen (Weissmann et al. 2006) durch die Applikation von 5 μ M Larixylacetat vollständig inhibiert (Urban et al. 2016). Durch alle diese Ergebnisse erscheinen Experimente mit beiden TRP-Kanal-Inhibitoren zunächst im Mausmodell der PF besonders wichtig und wären ein erster Schritt zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für die Behandlung der PF im Patienten.

5 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der TRPC6-Kanal eine entscheidende Rolle während der Ausbildung einer Lungenfibrose spielt. Belegt wurde dies *in vivo* durch eine verlängerte Überlebensrate, verbesserte Lungenfunktion und verminderte Kollagen-Expression in TRPC6-defizienten Lungen nach Behandlung mit Bleomycin. Auf zellulärer Ebene konnte in primären Lungenfibroblasten aus TRPC6-defizienten Mäusen eine verminderte EZM-Produktion, ein geringerer Ca^{2+} -Einstrom und eine verminderte Zellkontraktilität sowie eine geringere Konzentration von nukleärem NFAT nachgewiesen werden. Das TRPC6-Protein könnte sogar in Zukunft als wichtiger Biomarker für die Myofibroblasten-Differenzierung eingesetzt werden, da seine Expression durch die Behandlung mit TGF- β_1 induziert wird. Untersuchungen zur Rolle von TRPC6 an der Entwicklung der Lungenfibrose in anderen beteiligten Zellen (z.B. Fibrozyten, Perizyten, Endothel- oder Epithelzellen) stehen noch aus. In Zukunft sollte die Wirkung des TRPC6-Kanalblockers Larixylacetat im Bleomycin-Modell der PF und während der Myofibroblasten-Transformation durch TGF- β_1 als erster Schritt zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für die Behandlung von Patienten mit PF genauer analysiert werden.

Anhang

Tabellenverzeichnis

TABELLE 2-1: MAUSLINIEN	31
TABELLE 2-2: ZELLEN	31
TABELLE 2-3: ZELLKULTUR-LÖSUNGEN	32
TABELLE 2-4: ZELLSPEZIFISCHE MEDIEN	32
TABELLE 2-5: CHEMIKALIEN	33
TABELLE 2-6: VERBRAUCHSMATERIALIEN	37
TABELLE 2-7: LABORAUSSTATTUNG	38
TABELLE 2-8: PUFFER UND LÖSUNGEN	40
TABELLE 2-9: KITS	43
TABELLE 2-10: MARKER	44
TABELLE 2-11: AUFLISTUNG ALLER VERWENDETEN MURINEN PRIMER	44
TABELLE 2-12: TABELLARISCHE AUFLISTUNG ALLER VERWENDETEN ERSTANTIKÖRPER ..	46
TABELLE 2-13: TABELLARISCHE AUFLISTUNG ALLER VERWENDETEN ZWEITANTIKÖRPER	47
TABELLE 2-14: „MASTERMIX“	49
TABELLE 2-15: „LIGHTCYCLER“ PROGRAMM FÜR TRPC-OLIGONUKLEOTIDE	49
TABELLE 2-16: LIGHTCYCLER PROGRAMM FÜR OLIGONUKLEOTIDE DER FIBROSEMARKER	50
TABELLE 2-17: HERSTELLUNG SDS-TRENNGEL	56
TABELLE 2-18: HERSTELLUNG SDS-SAMMELGEL	56
TABELLE 2-19: CHROMATOGRAPHIE BEDINGUNGEN FÜR DIE BESTIMMUNG VON HYDROXYPROLIN DURCH HPLC	61
TABELLE 2-20: ENTWÄSSERUNG DES LUNGENGEBEWES	70
TABELLE 2-21: ENTPARAFFINIERUNG	71
TABELLE 2-22: PROTOKOLL FÜR DIE HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	71
TABELLE 2-23: PROTOKOLL FÜR DIE MASSON-TRICHROM-FÄRBUNG	72
TABELLE 2-24: PROTOKOLL FÜR DIE ENTWÄSSERUNG	72

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: KLINISCHE VERLAUFSFORMEN UND ÜBERLEBENSRATE („SURVIVAL %“) DER IPF.....	5
ABBILDUNG 2: SCHEMATA ZUM KLINISCHEN ERSCHEINUNGSBILD DER LUNGENFIBROSE ...	7
ABBILDUNG 3: ÜBERSICHT ÜBER DEN URSPRUNG DER FIBROBLASTEN WÄHREND DER IPF	9
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN ZELLULÄREN URSPRÜNGE FÜR MYOFIBROBLASTEN WÄHREND DER AUSBILDUNG EINER IPF	11
ABBILDUNG 5: TROMMELSCHLEGELFINGER	13
ABBILDUNG 6: RÖNTGENBILD EINER GESUNDEN UND EINER IPF LUNGE.....	14
ABBILDUNG 7: VERTEILUNG DER FIBRÖSEN VERÄNDERUNGEN WÄHREND EINER IPF.....	15
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INTRATRACHEALEN BLEOMYCIN-APPLIKATION.....	17
ABBILDUNG 9: PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM DER SÄUGETIER-TRP-KANÄLE	19
ABBILDUNG 10: STRUKTUR VON TRP-KANÄLEN	20
ABBILDUNG 11: ÄHNLICHKEITEN UND UNTERSCHIEDE IN DER TOPOLOGIE DER TRP-UNTERFAMILIE.....	21
ABBILDUNG 12: SCHEMATISCHER AUFBAU DES TRPC6-KANALS.....	24
ABBILDUNG 13: HOMO- UND HETEROMULTIMERISIERUNGSPOTENTIAL DES TRPC6-KANALS	24
ABBILDUNG 14: SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADEN FÜR DEN TRPC6-INDUZIERTEN Ca^{2+} -EINSTROM UND MÖGLICHE PHYSIOLOGISCHE REAKTIONEN AUF DIE ERHÖHUNG DER INTRAZELLULÄREN Ca^{2+} -KONZENTRATION.....	26
ABBILDUNG 15: BILDICHE DARSTELLUNG DER ZIELE DIESER ARBEIT.....	30
ABBILDUNG 16: REPRÄSENTATIVES BILD FÜR EINE GRAUSTUFENAUSWERTUNG NACH IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	58
ABBILDUNG 17: SCHEMATISCHER AUFBAU EINER HPLC-ANLAGE	59
ABBILDUNG 18: DERIVATISIERUNG VON HYDROXYPROLIN: REAKTIONSMCHANISMUS VON NBD-CL UND HYDROXYPROLIN (HYP)	60
ABBILDUNG 19: BALKENDIAGRAMM DER „AREA-UNDER-THE-CURVE“ (AUC)-WERTE DER HYDROXYPROLIN-STANDARKURVE.....	62
ABBILDUNG 20: STANDARKURVE FÜR HYDROXYPROLIN	62
ABBILDUNG 21: SCHEMATISCHER ABLAUF DES KONTRAKTIONSSASSAYS.....	63
ABBILDUNG 22: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ECIS-METHODE.....	65
ABBILDUNG 23: BEISPIEL FÜR EINE MESSUNG DES ZELLWIDERSTANDS IM ECIS-GERÄT ...	66
ABBILDUNG 24: LUNGENFUNKTIONSMESSUNG	69
ABBILDUNG 25: ZEITLICHER VERLAUF DES IN-VIVO-MODELLS DER EXPERIMENTELLEN LUNGENFIBROSE	74
ABBILDUNG 26: NACHWEIS DES TRPC6-PROTEINS IN LUNGENLYSATEN VON WILDTYP (WT)-UND TRPC6-DEFIZIENTEN MÄUSEN DURCH „IMMUNOBLOTTING“	75
ABBILDUNG 27: KÖRPERGEWICHT DER UNTERSUCHTEN MÄUSE NACH BLEOMYCIN/PBS-	

APPLIKATION.....	76
ABBILDUNG 28: ÜBERLEBENSKURVE („KAPLAN-MEIER-PLOT“) DER WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN MÄUSE NACH BLEOMYCIN/PBS-APPLIKATION	77
ABBILDUNG 29: „RESISTANCE“ (ATEMWEGSWIDERSTAND)	78
ABBILDUNG 30: „ELASTANCE“ (ELASTISCHER LUNGENWIDERSTAND).....	79
ABBILDUNG 31: „COMPLIANCE“ (LUNGENDEHNBARKEIT).....	80
ABBILDUNG 32: REPRÄSENTATIVE BILDER DER H&E-FÄRBUNG VON HISTOLOGISCHEN LUNGENSCHNITTEN AUS WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN (TRPC6 ^{-/-}) MÄUSEN NACH BEHANDLUNG MIT BLEOMYCIN (BLEO) ODER PBS	81
ABBILDUNG 33: REPRÄSENTATIVE BILDER DER MASSON-TRICHROM-FÄRBUNG VON HISTOLOGISCHEN LUNGENSCHNITTEN AUS WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN (TRPC6 ^{-/-}) MÄUSEN NACH BEHANDLUNG MIT BLEOMYCIN (BLEO) ODER PBS.....	82
ABBILDUNG 34: GENEXPRESSION DER EXTRAZELLULÄREN MATRIXPROTEINE FIBRONEKTIN UND KOLLAGEN-TYP1 α 1 IN DER GESAMTLUNGE DER MÄUSE AM TAG 14 NACH DER BLEOMYCIN-APPLIKATION	83
ABBILDUNG 35: GENEXPRESSION DER FIBROSEMARKER α -GLATTES MUSKELAKTIN UND PLASMINOGEN-AKTIVATOR-INHIBITOR TYP1 IN DER GESAMTLUNGE DER MÄUSE AM TAG 14 NACH DER BLEOMYCINAPPLIKATION	84
ABBILDUNG 36: QUANTIFIZIERUNG DES HYDROXYPROLINGEHALTES IM LUNGENGeweBE DER MÄUSE AM TAG 14 NACH DER BLEOMYCIN-APPLIKATION	85
ABBILDUNG 37: NACHWEIS VON α -GLATTEN MUSKELAKTIN-, FIBRONEKTIN1- UND KOLLAGEN TYP1 α 1-MRNA DURCH QUANTITATIVE RT-QPCR IN PRIMÄREN LUNGENFIBROBLASTEN ISOLIERT AUS WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN MÄUSEN	86
ABBILDUNG 38: NACHWEIS VON α -GLATTEN MUSKELAKTIN (α SMA) IN PRIMÄREN MURINEN LUNGEFIBROBLASTEN	88
ABBILDUNG 39: NACHWEIS VON α -GLATTEN MUSKELAKTIN (α SMA) UND DEM ZYTOSKELETT IN PRIMÄREN MURINEN WILDTYP-LUNGEFIBROBLASTEN	89
ABBILDUNG 40: NACHWEIS VON FIBRONEKTIN1 (FN1) IN PRIMÄREN MURINEN LUNGEFIBROBLASTEN	90
ABBILDUNG 41: NACHWEIS VON FIBRONEKTIN1 (FN1) UND DEM ZYTOSKELETT IN PRIMÄREN MURINEN WILDTYP-LUNGEFIBROBLASTEN	91
ABBILDUNG 42: NACHWEIS VON KOLLAGEN TYP1 α 1 (COLL1 α 1) IN PRIMÄREN MURINEN LUNGEFIBROBLASTEN	92
ABBILDUNG 43: NACHWEIS VON KOLLAGEN TYP1 α 1 (COLL1 α 1) UND DEM ZYTOSKELETT IN PRIMÄREN MURINEN WILDTYP-LUNGEFIBROBLASTEN	93
ABBILDUNG 44: PHASENKONTRASTBILDER VON PRIMÄREN MURINEN LUNGENFIBROBLASTEN ISOLIERT AUS WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN MÄUSEN	94
ABBILDUNG 45: NACHWEIS VON TRPC (TRPC1-7)-MRNA DURCH QUANTITATIVE RT-PCR IN PRIMÄREN MURINEN LUNGENFIBROBLASTEN AUS WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN MÄUSEN	95

ABBILDUNG 46: NACHWEIS DER GENEXPRESSION DER DIFFERENZIERUNGSMARKER α SMA UND PAI-1 DURCH QUANTITATIVE RT-PCR VON MRNA AUS PMLF, DIE MIT TGF- β_1 ODER LÖSUNGSMITTEL INKUBIERT WURDEN	96
ABBILDUNG 47: NACHWEIS DER GENEXPRESSION DES TRPC6-KANALS DURCH QUANTITATIVE RT-PCR VON MRNA IN PMLF, DIE MIT TGF- β_1 ODER LÖSUNGSMITTEL INKUBIERT WURDEN.....	97
ABBILDUNG 48: NACHWEIS VON α SMA-PROTEIN IN TGF- β_1 - UND MIT LÖSUNGSMITTEL-BEHANDELTEN PMLF IM WESTERN BLOT.....	98
ABBILDUNG 49: NACHWEIS VON TRPC6-PROTEIN IN TGF- β_1 - UND MIT LÖSUNGSMITTEL - BEHANDELTEN PMLF IM WESTERN BLOT.....	99
ABBILDUNG 50: NACHWEIS DER AKTINSTRESSFASERBILDUNG IN WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN PMLF, DIE MIT LÖSUNGSMITTEL ODER TGF- β_1 BEHANDELT WURDEN	100
ABBILDUNG 51: QUANTIFIZIERUNG DER AKTINSTRESSFASERBILDUNG IN WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN PMLF, DIE MIT LÖSUNGSMITTEL ODER MIT TGF- β_1 BEHANDELT WURDEN	101
ABBILDUNG 52: Ca^{2+} -EINSTROM IN MIT LÖSUNGSMITTEL- ODER TGF- β_1 -BEHANDELTEN WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN PMLF	102
ABBILDUNG 53: QUANTIFIZIERUNG DER „AREA UNDER THE CURVE“ (AUC) DES OAG-INDUZIERTEN Ca^{2+} -EINSTROMS IN WT- UND TRPC6-DEFIZIENTEN PMLF DIE MIT LÖSUNGSMITTEL ODER TGF- β_1 BEHANDELT WURDEN	103
ABBILDUNG 54: NACHWEIS DER NFATc1-TRANSLOKATION IN DEN ZELLKERN VON PMLF NACH DER BEHANDLUNG MIT TGF- β_1 ODER LÖSUNGSMITTEL MITTELS WESTERN BLOT	104
ABBILDUNG 55: ANALYSE DES ZELLWIDERSTANDES IN MIT TGF- β_1 - ODER LÖSUNGSMITTEL-BEHANDELTEN PMLF	105
ABBILDUNG 56: QUANTIFIZIERUNG DER „AREA UNDER THE CURVE “ (AUC) DER WIDERSTANDSMESSUNGEN IN PMLF	106
ABBILDUNG 57: ANALYSE DER KONTRAKTION EINER KOLLAGENMATRIX DURCH PMLF, DIE MIT TGF- β_1 ODER LÖSUNGSMITTEL BEHANDELT WURDEN	107

Literaturverzeichnis

- Adamson, I.** (1976). "Pulmonary toxicity of bleomycin." *Environmental Health Perspectives* 16: 119.
- Agostini, C. and C. Gurrieri** (2006). "Chemokine/cytokine cocktail in idiopathic pulmonary fibrosis." *Proceedings of the American Thoracic Society* 3(4): 357-363.
- Bartram, U. and C. P. Speer** (2004). "The role of transforming growth factor β in lung development and disease." *CHEST Journal* 125(2): 754-765.
- Baum, J. and H. S. Duffy** (2011). "Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?" *Journal of cardiovascular pharmacology* 57(4): 376.
- Behr, J., A. Günther, et al.** (2013). "S2K-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der idiopathischen Lungenfibrose." *Pneumologie* 67(02): 81-111.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al.** (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nature reviews Molecular cell biology* 1(1): 11-21.
- Bon, R. S. and D. J. Beech** (2013). "In pursuit of small molecule chemistry for calcium - permeable non - selective TRPC channels—mirage or pot of gold?" *British journal of pharmacology* 170(3): 459-474.
- Bosc, L. V. G., J. J. Layne, et al.** (2005). "Nuclear factor of activated T cells and serum response factor cooperatively regulate the activity of an α -actin intronic enhancer." *Journal of Biological Chemistry* 280(28): 26113-26120.
- Boulay, G., X. Zhu, et al.** (1997). "Cloning and Expression of a Novel Mammalian Homolog of Drosophila Transient Receptor Potential (Trp) Involved in Calcium Entry Secondary to Activation of Receptors Coupled by the Gq Class of G Protein." *Journal of Biological Chemistry* 272(47): 29672-29680.
- Cahalan, M. D.** (2009). "STIMulating store-operated Ca^{2+} entry." *Nature Cell Biology* 11(6): 669-677.
- Campa, J. S., R. J. McAnulty, et al.** (1990). "Application of high-pressure liquid chromatography to studies of collagen production by isolated cells in culture." *Analytical biochemistry* 186(2): 257-263.
- Carreño, O., R. Corominas, et al.** (2012). "SNP variants within the vanilloid TRPV1 and TRPV3 receptor genes are associated with migraine in the Spanish population."

American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics 159(1): 94-103.

Caterina, M. J., M. A. Schumacher, et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* 389(6653): 816-824.

Cavazza, A., G. Rossi, et al. (2010). "The role of histology in idiopathic pulmonary fibrosis: an update." *Respiratory medicine* 104: S11-S22.

Chaudhary, N. I., A. Schnapp, et al. (2006). "Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model." *American journal of respiratory and critical care medicine* 173(7): 769-776.

ChestX-ray.com (2014). "Thorax-Röntgenbild." [letzter Zugriff am 16.07.2017]
<http://www.chestx-ray.com/index.php/education/normal-cxr-module-train-your-eye#!3>.

Choi, S., J. Maleth, et al. (2014). The TRPCs–STIM1–Orai interaction. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, Springer: 1035-1054.

Chung, K. (2001). "Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease." *European Respiratory Journal* 18(34 suppl): 50s-59s.

Chung, M. P., M. M. Monick, et al. (2003). "Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 29(3): 375-380.

Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." *Nature* 426(6966): 517-524.

Clapham, D. E., L. W. Runnels, et al. (2001). "The TRP ion channel family." *Nature Reviews Neuroscience* 2(6): 387-396.

Cobbs, S. L. and J. L. Gooch (2007). "NFATc is required for TGF β -mediated transcriptional regulation of fibronectin." *Biochemical and biophysical research communications* 362(2): 288-294.

Cool, C. D., S. D. Groshong, et al. (2006). "Fibroblast foci are not discrete sites of lung injury or repair: the fibroblast reticulum." *American journal of respiratory and critical care medicine* 174(6): 654-658.

Cosens, D. and A. Manning (1969). "Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant."

Davis, J., A. R. Burr, et al. (2012). "A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo." *Developmental cell* 23(4): 705-715.

- de BOER, W. I., A. van SCHADEWIJK, et al.** (1998). "Transforming growth factor β 1 and recruitment of macrophages and mast cells in airways in chronic obstructive pulmonary disease." *American journal of respiratory and critical care medicine* 158(6): 1951-1957.
- De Perrot, M., M. Liu, et al.** (2003). "Ischemia–reperfusion–induced lung injury." *American journal of respiratory and critical care medicine* 167(4): 490-511.
- Degryse, A. L. and W. E. Lawson** (2011). "Progress toward improving animal models for IPF." *The American journal of the medical sciences* 341(6): 444.
- Dietrich, A., V. Chubanov, et al.** (2010). "Renal TRP channels." *Journal of the American Society of Nephrology* 21(5): 736-744.
- Dietrich, A. and T. Gudermann** (2014). TRPC6: physiological function and pathophysiological relevance. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, Springer: 157-188.
- Dietrich, A., M. M. y Schnitzler, et al.** (2003). "N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity." *Journal of Biological Chemistry* 278(48): 47842-47852.
- Dietrich, A., M. M. y Schnitzler, et al.** (2005). "Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6–/– mice." *Molecular and cellular biology* 25(16): 6980-6989.
- Earley, S. and J. E. Brayden** (2015). "Transient receptor potential channels in the vasculature." *Physiological reviews* 95(2): 645-690.
- eesomAG** (2016). "Trommelschlegelfinger."
- EncapsulaNanoSciencesLLC** (2014). "Intratracheale Applikation." [letzter Zugriff am 16.07.2017] <http://www.clodrosome.com/animal-injection/>.
- ERS Monography** (2016). Idiopathic Pulmonary Fibrosis.
- Euler, U. v. and G. Liljestrand** (1946). "Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat." *Acta Physiologica Scandinavica* 12(4): 301-320.
- Eyden, B.** (2008). "The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine." *Journal of cellular and molecular medicine* 12(1): 22-37.

- Fala, L.** (2015). "Ofev (Nintedanib): First Tyrosine Kinase Inhibitor Approved for the Treatment of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *American health & drug benefits* 8(Spec Feature): 101.
- Fernandez, I. E. and O. Eickelberg** (2012). "The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers." *Proceedings of the American Thoracic Society* 9(3): 111-116.
- Fernandez, I. E. and O. Eickelberg** (2012). "New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis." *The Lancet* 380(9842): 680-688.
- Foster, R. R., M. A. Zadeh, et al.** (2009). "Flufenamic acid is a tool for investigating TRPC6-mediated calcium signalling in human conditionally immortalised podocytes and HEK293 cells." *Cell calcium* 45(4): 384-390.
- Frantz, C., K. M. Stewart, et al.** (2010). "The extracellular matrix at a glance." *J Cell Sci* 123(24): 4195-4200.
- Fuchs, B., M. Rupp, et al.** (2011). "Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6." *Respiratory research* 12(1): 1.
- Gaudet, R.** (2008). "TRP channels entering the structural era." *The Journal of physiology* 586(15): 3565-3575.
- Gees, M., B. Colasoul, et al.** (2010). "The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(10): a003962.
- Ghosh, A. K. and D. E. Vaughan** (2012). "PAI - 1 in tissue fibrosis." *Journal of cellular physiology* 227(2): 493-507.
- Giaever, I. and C. Keese** (1984). "Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81(12): 3761-3764.
- Goel, M., W. G. Sinkins, et al.** (2002). "Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes." *Journal of Biological Chemistry* 277(50): 48303-48310.
- Harteneck, C. and M. Gollasch** (2011). "Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels." *Current pharmaceutical biotechnology* 12(1): 35-41.

Hashimoto, N., H. Jin, et al. (2004). "Bone marrow–derived progenitor cells in pulmonary fibrosis." *The Journal of clinical investigation* 113(2): 243-252.

Heinzelmann, K., N. Noskovičová, et al. (2016). "Surface proteome analysis identifies platelet derived growth factor receptor-alpha as a critical mediator of transforming growth factor-beta-induced collagen secretion." *The international journal of biochemistry & cell biology* 74: 44-59.

HelmholtzZentrumMünchen (2016). "Lungeninformationsdienst." [letzter Zugriff am 16.07.2017] <http://www.lungeninformationsdienst.de/krankheiten/lungenfibrose/index.html>.

Hinz, B. (2007). "Formation and function of the myofibroblast during tissue repair." *Journal of Investigative Dermatology* 127(3): 526-537.

Hinz, B. (2010). "The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell." *Journal of biomechanics* 43(1): 146-155.

Hinz, B., S. H. Phan, et al. (2012). "Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling." *The American journal of pathology* 180(4): 1340-1355.

Hofmann, T., A. G. Obukhov, et al. (1999). "Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol." *Nature* 397(6716): 259-263.

Hofmann, T., M. Schaefer, et al. (2000). "Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry." *Journal of molecular medicine* 78(1): 14-25.

Hofmann, T., M. Schaefer, et al. (2002). "Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(11): 7461-7466.

Hung, C., G. Linn, et al. (2013). "Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis." *American journal of respiratory and critical care medicine* 188(7): 820-830.

Hynes, R. O. and A. Naba (2012). "Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4(1): a004903.

Inoue, R., T. Okada, et al. (2001). "The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular α 1-adrenoceptor–activated Ca^{2+} -permeable cation channel." *Circulation research* 88(3): 325-332.

- John-Schuster, G., K. Hager, et al.** (2014). "Cigarette smoke-induced iBALT mediates macrophage activation in a B cell-dependent manner in COPD." *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 307(9): L692-L706.
- Jung, S., A. Mühle, et al.** (2003). "Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth." *Journal of Biological Chemistry* 278(6): 3562-3571.
- Katzenstein, A.-L. A. and J. L. Myers** (1998). "Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification." *American journal of respiratory and critical care medicine* 157(4): 1301-1315.
- Kim, K. K., M. C. Kugler, et al.** (2006). "Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(35): 13180-13185.
- King, T. E., A. Pardo, et al.** (2011). "Idiopathic pulmonary fibrosis." *The Lancet* 378(9807): 1949-1961.
- Klingberg, F., B. Hinz, et al.** (2013). "The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis." *The Journal of pathology* 229(2): 298-309.
- Königshoff, M. and P. Bonniaud** (2014). "Live and Let Die: Targeting Alveolar Epithelial Cell Proliferation in Pulmonary Fibrosis." *American journal of respiratory and critical care medicine* 190(12): 1339-1341.
- Léjard, V., G. Brideau, et al.** (2007). "Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro- $\alpha 1$ (I) collagen gene in tendon fibroblasts." *Journal of Biological Chemistry* 282(24): 17665-17675.
- Leuner, K., V. Kazanski, et al.** (2007). "Hyperforin—a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels." *The FASEB Journal* 21(14): 4101-4111.
- Li, Y., Y. S. Kang, et al.** (2008). "Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria." *The American journal of pathology* 172(2): 299-308.
- Liao, Y., C. Erxleben, et al.** (2008). "Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(8): 2895-2900.

- Liedtke, W.** (2008). "Molecular mechanisms of TRPV4 - mediated neural signaling." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1144(1): 42-52.
- Loomis-King, H., K. R. Flaherty, et al.** (2013). "Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis." *Current opinion in pharmacology* 13(3): 377-385.
- Maharaj, S., C. Shimbori, et al.** (2013). "Fibrocytes in pulmonary fibrosis: a brief synopsis." *European Respiratory Review* 22(130): 552-557.
- Maher, T. M., I. C. Evans, et al.** (2010). "Diminished prostaglandin E2 contributes to the apoptosis paradox in idiopathic pulmonary fibrosis." *American journal of respiratory and critical care medicine* 182(1): 73-82.
- Maier, T., M. Follmann, et al.** (2015). "Discovery and pharmacological characterization of a novel potent inhibitor of diacylglycerol - sensitive TRPC cation channels." *British journal of pharmacology* 172(14): 3650-3660.
- Malczyk, M., C. Veith, et al.** (2013). "Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension." *American journal of respiratory and critical care medicine* 188(12): 1451-1459.
- Malczyk, M., C. Veith, et al.** (2016). "NADPH oxidases—do they play a role in TRPC regulation under hypoxia?" *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 468(1): 23-41.
- McAnulty, R. J.** (2007). "Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease." *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(4): 666-671.
- McDonald, S., P. Rubin, et al.** (1993). "Pulmonary changes induced by combined mouse β -interferon (rMuIFN- β) and irradiation in normal mice—toxic versus protective effects." *Radiotherapy and oncology* 26(3): 212-218.
- McKemy, D. D., W. M. Neuhausser, et al.** (2002). "Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation." *Nature* 416(6876): 52-58.
- Minke, B. and B. Cook** (2002). "TRP channel proteins and signal transduction." *Physiological reviews* 82(2): 429-472.
- Moeller, A., J. C. Rodriguez-Lecompte, et al.** (2006). "Models of pulmonary fibrosis." *Drug Discovery Today: Disease Models* 3(3): 243-249.

- Montell, C., L. Birnbaumer, et al.** (2002). "A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels." *Molecular cell* 9(2): 229-231.
- Montell, C. and G. M. Rubin** (1989). "Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." *Neuron* 2(4): 1313-1323.
- Montorfano, I., A. Becerra, et al.** (2014). "Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF- β 1 and TGF- β 2-dependent pathway." *Laboratory Investigation* 94(10): 1068-1082.
- Moore, B., W. E. Lawson, et al.** (2013). "Animal models of fibrotic lung disease." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 49(2): 167-179.
- Mouratis, M. A. and V. Aidinis** (2011). "Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin." *Current opinion in pulmonary medicine* 17(5): 355-361.
- Mubarak, K. K., A. Montes-Worboys, et al.** (2012). "Parenchymal trafficking of pleural mesothelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis." *European Respiratory Journal* 39(1): 133-140.
- Mueller-Mang, C., C. Grosse, et al.** (2007). "What Every Radiologist Should Know about Idiopathic Interstitial Pneumonias 1." *Radiographics* 27(3): 595-615.
- Mutsaers, S. E., M. L. Foster, et al.** (1998). "Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats." *American journal of respiratory cell and molecular biology* 18(5): 611-619.
- Myers, J. L. and A. Katzenstein** (1988). "Epithelial necrosis and alveolar collapse in the pathogenesis of usual interstitial pneumonia." *CHEST Journal* 94(6): 1309-1311.
- Nanthakumar, C. B., R. J. Hatley, et al.** (2015). "Dissecting fibrosis: therapeutic insights from the small-molecule toolbox." *Nature reviews Drug discovery*.
- Nho, R. S., P. Hergert, et al.** (2011). "Pathological alteration of FoxO3a activity promotes idiopathic pulmonary fibrosis fibroblast proliferation on type I collagen matrix." *The American journal of pathology* 179(5): 2420-2430.
- Nicholson, A. G., L. G. Fulford, et al.** (2002). "The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis." *American journal of respiratory and critical care medicine* 166(2): 173-177.
- Nilius, B. and G. Owsianik** (2010). "Transient receptor potential channelopathies." *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 460(2): 437-450.

- Nilius, B. and A. Szallasi** (2014). "Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine." *Pharmacological reviews* 66(3): 676-814.
- Overall, C. M.** (2002). "Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity." *Molecular biotechnology* 22(1): 51-86.
- Owsianik, G., D. D'hoedt, et al.** (2006). Structure–function relationship of the TRP channel superfamily. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, Springer: 61-90.
- Pardo, A., M. Selman, et al.** (2008). "Approaching the degradome in idiopathic pulmonary fibrosis." *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(6): 1141-1155.
- Pathak, A. and S. Kumar** (2011). "From molecular signal activation to locomotion: an integrated, multiscale analysis of cell motility on defined matrices." *PloS one* 6(3): e18423.
- Perrin, S. D., A. Ulano, et al.** (2009). "Revisiting the pattern approach to interstitial lung disease on chest radiography." *APPLIED RADIOLOGY*.
- Phan, S. H.** (2008). "Biology of fibroblasts and myofibroblasts." *Proceedings of the American Thoracic Society* 5(3): 334-337.
- Raghu, G., H. R. Collard, et al.** (2011). "An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management." *American journal of respiratory and critical care medicine* 183(6): 788-824.
- Rahaman, S. O., L. M. Grove, et al.** (2014). "TRPV4 mediates myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis in mice." *The Journal of clinical investigation* 124(12): 5225-5238.
- Ricard-Blum, S.** (2011). "The collagen family." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(1): a004978.
- Sandbo, N. and N. Dulin** (2011). "Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: ultrastructure defining form and driving function." *Translational Research* 158(4): 181-196.
- Scotton, C. J. and R. C. Chambers** (2007). "Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus." *CHEST Journal* 132(4): 1311-1321.
- Sell, T. S., T. Belkacemi, et al.** (2014). "Protonophore properties of hyperforin are essential for its pharmacological activity." *Scientific reports* 4.

- Selman, M., T. E. King, et al.** (2001). "Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy." *Annals of internal medicine* 134(2): 136-151.
- Selman, M. and A. Pardo** (2001). "Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder." *Respiratory research* 3(1): 1.
- Selvaggio, A. S. and P. W. Ie** (2016). "Pirfenidone Initiates a New Era in the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Annual review of medicine* 67: 487-495.
- Serini, G., M.-L. Bochaton-Piallat, et al.** (1998). "The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor- β 1." *The Journal of cell biology* 142(3): 873-881.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, et al.** (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical biochemistry* 150(1): 76-85.
- Staab-Weijnitz, C. A., I. E. Fernandez, et al.** (2015). "FK506-binding protein 10, a potential novel drug target for idiopathic pulmonary fibrosis." *American journal of respiratory and critical care medicine* 192(4): 455-467.
- Stolwijk, J. A., K. Matrougui, et al.** (2015). "Impedance analysis of GPCR-mediated changes in endothelial barrier function: overview and fundamental considerations for stable and reproducible measurements." *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology* 467(10): 2193-2218.
- Storch, U., A.-L. Forst, et al.** (2012). "Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes." *Journal of Biological Chemistry* 287(5): 3530-3540.
- Strieter, R. M., E. C. Keeley, et al.** (2009). "The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis." *Journal of leukocyte biology* 86(5): 1111-1118.
- Strotmann, R., C. Harteneck, et al.** (2000). "OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity." *Nature Cell Biology* 2(10): 695-702.
- Strübing, C., G. Krapivinsky, et al.** (2003). "Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain." *Journal of Biological Chemistry* 278(40): 39014-39019.

- Takeda, A., D. Higuchi, et al.** (1996). "Purification and characterization of bleomycin hydrolase, which represents a new family of cysteine proteases, from rat skin." *Journal of biochemistry* 119(1): 29-36.
- Tanjore, H., D.-S. Cheng, et al.** (2011). "Alveolar epithelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition in response to endoplasmic reticulum stress." *Journal of Biological Chemistry* 286(35): 30972-30980.
- TheLindeGroup** (2016). "High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)." [letzter Zugriff am 16.07.2017]
http://www.lindeus.com/en/industries/laboratories/analysis_and_measurement/high-performance_liquid_chromatography/index.html.
- Thorneloe, K. S., M. Cheung, et al.** (2012). "An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure." *Science translational medicine* 4(159): 159ra148-159ra148.
- Tu, P., J. Gibon, et al.** (2010). "The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria." *Journal of neurochemistry* 112(1): 204-213.
- Urban, N., K. Hill, et al.** (2012). "Novel pharmacological TRPC inhibitors block hypoxia-induced vasoconstriction." *Cell calcium* 51(2): 194-206.
- Urban, N., L. Wang, et al.** (2016). "Identification and Validation of Larixyl Acetate as a Potent TRPC6 Inhibitor." *Molecular pharmacology* 89(1): 197-213.
- Venkatachalam, K. and C. Montell** (2007). "TRP channels." *Annual review of biochemistry* 76: 387.
- Venkatachalam, K., D. B. van Rossum, et al.** (2002). "The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry." *Nature Cell Biology* 4(11): E263-E272.
- Vriens, J., H. Watanabe, et al.** (2004). "Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(1): 396-401.
- Weissmann, N., A. Dietrich, et al.** (2006). "Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(50): 19093-19098.
- Weissmann, N., A. Sydykov, et al.** (2012). "Activation of TRPC6 channels is essential for lung ischaemia-reperfusion induced oedema in mice." *Nature communications* 3: 649.

- Wes, P. D., J. Chevesich, et al.** (1995). "TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(21): 9652-9656.
- White, E. S.** (2015). "Lung extracellular matrix and fibroblast function." *Annals of the American Thoracic Society* 12(Supplement 1): S30-S33.
- Williams, K. and J. Roman** (2016). "Studying human respiratory disease in animals—role of induced and naturally occurring models." *The Journal of pathology* 238(2): 220-232.
- Winn, M. P., P. J. Conlon, et al.** (2005). "A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis." *Science* 308(5729): 1801-1804.
- Woudenberg-Vrenken, T. E., R. J. Bindels, et al.** (2009). "The role of transient receptor potential channels in kidney disease." *Nature Reviews Nephrology* 5(8): 441-449.
- Yuan, J. P., M. S. Kim, et al.** (2009). "TRPC channels as STIM1-regulated SOCs." *Channels* 3(4): 221-225.
- Zhu, X., P. B. Chu, et al.** (1995). "Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the *Drosophila* trp gene." *FEBS letters* 373(3): 193-198.
- Zhu, X., M. Jiang, et al.** (1996). "trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry." *Cell* 85(5): 661-671.
- Zitt, C., A. Zobel, et al.** (1996). "Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion." *Neuron* 16(6): 1189-1196.

Eidesstattliche Versicherung

Hofmann, Katharina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

**Molekulare Analyse des TRPC6-Kanals während der Ausbildung einer
pulmonalen Fibrose**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06.02.2018

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Danksagung

Während diese Arbeit entstanden ist, sind so unglaublich viele wunderbare Dinge passiert und ich bin so vielen neuen großartigen Menschen begegnet, dass ich sie gar nicht alle aufzählen kann. Nur so viel: ich bin unglaublich dankbar für all die Momente, die zu diesen Bekanntschaften geführt haben und danke jedem Einzelnen, auch wenn ich hier sicher einige Namen vergessen werde.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Alexander Dietrich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken. Alexander, Du hattest immer ein offenes Ohr und zu jederzeit und in jeder Situation einen guten Rat für mich: danke Dir!

Ihm und unserem Institutsvorstand Prof. Dr. Thomas Gudermann danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit die Daten auf Kongressen präsentieren zu können.

Sehr viel Inspiration und Anregungen habe ich von meinen großartigen Kollegen der AG Dietrich, danke ihr Lieben, dass ihr euch immer so viele Gedanken gemacht habt und eure ständige Hilfsbereitschaft die großen und kleinen Probleme des Laboralltags zu meistern.

Tim, Oehli und Jana, Euch gilt ein besonderer Dank für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und den tollen Start am WSI. Oehli deine stets aufmunternden Worte und der immer funktionierende „Buschfunk“ waren immer eine große Unterstützung. Martina, Du bist für mich zu einer sehr guten Freundin geworden und ich möchte mich von ganzem Herzen bei dir dafür bedanken, dass in jeder Lebenslage stets auf dich Verlass war. Nicht weniger wichtig seid Ihr mir, Susanne, Bettina und Jonas, Euch danke ich für Eure unermüdliche und immer motivierte Unterstützung, gerade in der letzten Phase dieser Arbeit.

Euch allen danke ich von tiefstem Herzen für die tolle Zusammenarbeit, die freundliche Atmosphäre im Labor und dafür, dass ich nicht nur Arbeitskollegen, sondern Freunde gefunden habe. Ich vermisse es jeden Tag mit euch zu arbeiten und freue mich schon auf viele weitere Momente mit euch.

Bei Melanie Königshoff und ihrer ganzen Arbeitsgruppe möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich während dieser Arbeit so unterstützt haben, ihre Methoden und Wissen mit mir geteilt haben und ich immer eine tolle Zeit in Großhadern bzw. in Neuherberg hatte.

Auch gilt mein herzlicher Dank allen Mitgliedern der CPC Research School. Danke für die tolle Zeit die wir gerade während der Research School Meetings und Retreats hatten – durch euch wurden stressige Momente zu interessanten und tollen Erlebnissen. Vielen Dank nicht nur an meine Mitschüler sondern auch an Melanie, Camille und Doreen, die das alles so toll organisiert haben.

Bei Harald Mückter, Christine Hopfer und ihren „Mückter-Buam“ aber auch bei Franz Zehfuß möchte ich mich von ganzem Herzen für die moralische Unterstützung bedanken – ohne diese hätte ich an manchen Tagen vieles nicht geschafft. Gerade die langen Abende und Ausflüge mit Diskussionen über die Doktorarbeit hinaus werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Ein weiteres herzliches Dankeschön für die tolle Zusammenarbeit geht an die anderen Arbeitsgruppen des Walther-Straub-Institutes, die ich namentlich nicht alle erwähnen kann. Danke euch allen für die Aushilfe mit Chemikalien und Geräten und die erquickenden Mittagspausen und „Flurgespräche“.

Vielen Dank auch an alle Tierstallmitarbeiter, allen voran Petra Eigner für euren unermüdlichen Einsatz bei der Tierzucht und die netten Gespräche.

Mein tiefster Dank gilt den wichtigsten Menschen in meinem Leben: meiner Mama, meinem Papa und meinen Schwestern Vroni und Amelie. Ohne eure Liebe und Unterstützung wäre das alles nicht möglich gewesen. Auch eine sehr wichtige Person in meinem Leben bist du, Johannes. Ich danke dir von tiefstem Herzen dafür, dass du mich durch Höhen und Tiefen begleitest und immer wieder aufs Neue motivierst. Ihr alle wisst gar nicht, wie viel ihr mir bedeutet!